

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
20. November 2003 (20.11.2003)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/096044 A2**

PCT

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01R 33/46

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/01473

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. Mai 2003 (08.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 21 158.2 13. Mai 2002 (13.05.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: DIERCKS, Tammo [DE/DE]; Goslarerstr.  
125A, 70499 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING LIGANDS WHICH ARE BOUND TO A DRUG TARGET, USING HETERONUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUFFINDUNG VON LIGANDEN, DIE AN EIN DRUG TARGET BINDEN, MITTELS HETERONUKLEARER KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting ligands which are bound to a pre-determined drug target. Said method is based on the nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) measuring method and especially on the possibility of being able to clearly select the test substances by means of isotope marker, using NMR spectroscopy. The invention thus also relates to methods for creating corresponding substance banks, and involves the following aspects: (1) a method for creating a substance bank exclusively from compounds which contain at least one core of an NMR-observed element or isotope so that they can be observed by selective NMR-spectroscopy, said element or isotope being absent or only very rarely present in the drug target; (2) the substance bank which can be created by said method; and (3) a method for identifying active ingredients which are bound to a drug target, said method involving the substance bank and being characterised by the recording of NMR spectra which are edited or filtered according to the element or isotope present.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Auffindung von Liganden bereit, die an ein vorgegebenes drug target binden. Dieses Verfahren basiert auf der Messmethode der Kernresonanzspektroskopie (NMR) und speziell auf der Möglichkeit, die Testsubstanzen eindeutig anhand von Isotopenmarkern NMR-spekttral selektieren zu können. Hierzu beschreibt die vorliegende Erfindung auch Verfahren zum Aufbau entsprechender Substanzbanken. Die vorliegende Erfindung umfaßt demnach folgende Aspekte: (1) ein Verfahren zur Zusammenstellung einer Substanzbank ausschließlich aus solchen Verbindungen, die zum Zwecke ihrer selektiven NMR-spektroskopischen Beobachtbarkeit mindestens einen Kern eines NMR-beobachtbaren Elementes oder Isotopes enthalten, welches im drug target nicht oder nur mit sehr geringer Häufigkeit vorkommt; (2) die mit diesem Verfahren herstellbare Substanzbank; (3) ein Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen, die an ein drug target binden unter Verwendung dieser Substanzbank, welches durch die Aufnahme von nach dem vorliegenden Element bzw. Isotop editierten oder gefilterten NMR-Spektren gekennzeichnet ist.

WO 03/096044 A2

# Verfahren zur Auffindung von Liganden, die an ein drug target binden, mittels heteronuklearer Kernresonanzspektroskopie

## Beschreibung

### 1. Einleitung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung von Liganden, die an ein vorgegebenes drug target binden, mittels heteronuklearer Kernresonanzspektroskopie (NMR), sowie hierfür geeignete Substanzbanken und ein Verfahren zu deren Zusammenstellung.

### 2. Hintergrund und Stand der Technik

Die Suche nach Wirkstoff-Kandidaten in den *Life Sciences* (Pharma, Tier- und Pflanzenschutz) wird heute mittels vielfältiger biologischer, chemischer und physikalischer *Screening*-Verfahren betrieben. Dabei wird aus einer möglichst umfangreichen und chemisch diversen Sammlung niedermolekularer Substanzen nach Verbindungen gesucht, die an ein vorgegebenes krankheitsrelevantes Zielmolekül (*drug target*; in der Regel ein Protein, RNA- oder DNA-Abschnitt) binden und dessen biologische Funktion beeinflussen. Derart aufgefundene *Liganden (initial hits)* sind Ausgangsverbindungen für die Entwicklung von Wirkstoff-Kandidaten. Sie müssen in der anschließenden Phase der Wirkstoffentwicklung hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität gegenüber dem *drug target* in der Regel noch verbessert werden, bevor ihre Wirksamkeit, Toxizität und pharmakokinetischen Eigenschaften (wie die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung in biologischen Systemen) durch Variation der chemischen Struktur gemäß Prinzipien der medizinischen Chemie und ersten *in vivo* Tests angepaßt werden können. Bei diesen Wirkstoff-Optimierungsprozessen ist es von entscheidendem Vorteil, die relevanten Wechselwirkungen und Charakteristika der Bindung eines Liganden am *drug target* genau zu kennen. Basierend auf diesem Wissen kann die weitere Wirkstoffentwicklung rational, zielgerichtet und beschleunigt durchgeführt werden.

Die magnetische Kernresonanz-Spektroskopie (NMR), mit der molekulare Strukturen, Beweglichkeiten und Wechselwirkungen mit atomarer Auflösung charakterisiert werden können, bietet für die kommerzielle Wirkstoffsuche und -entwicklung eine Kombination besonderer Stärken, die nachfolgend näher ausgeführt sind. Sie löst damit viele Probleme, die alternativen Verfahren inhärent sind.

- NMR stellt eine universell einsetzbare physikalische Meßmethode dar, die das Screening nach (bindenden) Liganden ermöglicht. Es müssen also nicht erst zeitaufwändig system- bzw. funktionsspezifische biochemische Nachweisverfahren (*bio-assays*) entwickelt werden, die zudem das Risiko häufiger falsch-positiver Nachweise durch Nebenreaktionen bergen. Ebenso kann bereits ohne Kenntnis der Proteinfunktion unmittelbar im Anschluß an die Identifizierung eines *drug targets* (z.B. mittels Methoden der Bioinformatik) mit der Wirkstoffsuche per NMR begonnen werden.
- NMR ist die derzeit empfindlichste Screeningmethode zum Nachweis auch sehr schwach bindender Wirkstoff-Vorläufer. Sie kann daher insbesondere auch neuartige Ansätze der Wirkstoffentwicklung über neue Ausgangsmoleküle erschließen.
- NMR erlaubt zudem die Klassifizierung aufgefundener Liganden nach ihrer Bindungsstärke (Affinität) über einfache Titrationsexperimente.
- NMR liefert atomar aufgelöste Spektren. Damit können anhand von NMR-Spektren des *drug targets* unmittelbar verschiedene Bindungsstellen des Liganden am *drug target* erkannt und unterschieden werden. Dies wiederum erlaubt es, schnell unspezifische oder irrelevante Wechselwirkungen und damit falsch-positive Anzeigen auszuschließen. Mittels NMR-spektroskopischer Methoden (in Verbindung mit geeigneten rechnergestützten Simulationsverfahren wie *molecular dynamics* etc.) ist es weiterhin möglich, die räumliche Struktur des Komplexes aus Ligand und *drug target* und damit den Bindungsmodus zu bestimmen (H.-J.Böhm, G.Klebe, H.Kubinyi: "Wirkstoffdesign", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1996, Heidelberg/ Berlin/Oxford, ISBN 3-8274-0174-7). Die Entdeckung neuer Bindungsstellen und -modi eröffnet neuartige Ansätze der Wirkstoffentwicklung.
- Mittels NMR können molekulare Strukturen, Beweglichkeiten und Wechselwirkungen mit atomarer Auflösung bestimmt und umfassend charakterisiert werden. Damit schafft NMR die essentiellen Grundlagen für die erfolgreiche

Optimierung der aufgefundenen ersten bindenden Liganden (*initial hits*) nach Prinzipien der rationalen strukturbasierten Wirkstoffentwicklung (*rational drug design*). Die besondere Stärke der NMR-Spektroskopie liegt also in der Kombination und gleichzeitigen Eignung zum Aufspüren und zielgerichteten Optimieren neuer Liganden.

Grundlage für die Eignung der NMR-Spektroskopie zum Screening ist die Empfindlichkeit, mit der NMR-Signale auf bindungsinduzierte molekulare Veränderungen – wie beispielsweise der chemischen Umgebung, molekularen Struktur und Dynamik – reagieren. Hierdurch verändern sich oft mehrere Signalcharakteristika bzw. *Indikatoren* gleichzeitig, zu denen vor allem die Signalfrequenz, –intensität und –form gehören. Die *Reporter-Signale*, auf denen diese bindungsinduzierten Veränderungen erfasst werden, müssen dabei eindeutig im NMR-Spektrum erkannt und separiert werden können. Zwei methodische Hauptaspekte aller NMR-Screeningverfahren sind demnach die *Empfindlichkeit* des gewählten Indikators sowie die *Auflösbarkeit* bzw. *selektive Beobachtbarkeit* der gewählten Reporter-Signale.

Die Verfahren des NMR-Screenings können in prinzipiell zwei Klassen eingeteilt werden (Diercks, Coles et al.: *Current Opinion in Chemical Biology* 2001, 5, 285-291):

- auf den Liganden detektierende Verfahren (*ligandendetektierende Verfahren*)
- auf dem drug target detektierende Verfahren (*targetdetektierende Verfahren*)

Die meisten *ligandendetektierenden Verfahren*, bei denen nach bindungsinduzierten Veränderungen in den NMR-Spektren von Liganden gesucht wird, erfassen entweder direkte intermolekulare Wechselwirkungen zwischen dem drug target und einem Liganden über dipolare Relaxationsphänomene, oder aber die Abnahme der freien Beweglichkeit eines Liganden durch scheinbare Erhöhung der Molekülgröße aufgrund der Bindung an das (viel größere und trägere) drug target, d.h. die Verlangsamung seiner Diffusion und/oder Eigendrehung.

*Diffusion* wird NMR-spektroskopisch direkt über die Signalabnahme bei Einsatz magnetischer Feldgradienten-Echos erfasst. Bei der Diffusions-geordneten NMR-Spektroskopie, DOSY (Johnson: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 1999, 34, 203-256), wird die Abhängigkeit der Signalabnahme von Echostärke oder -dauer zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten aufgezeichnet. Diese werden dann in einer zweiten Pseudo-Dimension aufgetragen und erlauben so eine schnelle Auftrennung von Stoffgemischen in einzelne, verschieden schnell diffundierende Komponenten (Barjat,

Morris et al.: *Journal of Magnetic Resonance* 1995, **B108**, 170-172). Ein konstantes Feldgradienten-Echo wirkt als einfacher Diffusionsfilter, der die an das *drug target* bindenden Liganden selektiv dämpft. Ein derartiger Diffusionsfilter findet in dem in WO 98/48264 beschriebenen Verfahren des ligandendetektierenden NMR-Screenings Anwendung.

Die *molekulare Eigendrehung* ist nur indirekt über die Beeinflussung von NMR-Relaxationsprozessen zu erfassen. Hierzu gehört die entropische  $T_2$ -Relaxation, die zur Verbreiterung und Dämpfung der NMR-Signale führt und mit abnehmender Molekülbeweglichkeit zunimmt.  $T_2$ -Relaxationsraten können mit geeigneten NMR-Experimenten aus der Signalabnahme in Abhängigkeit von der Dauer einer SpinLock- oder z.B. CPMG-Echosequenz ermittelt werden. Eine konstante SpinLock- bzw. Echodauer wirkt als  $T_2$ -Relaxationsfilter, der analog dem beschriebenen Diffusionsfilter nur bindende Liganden dämpft. Dieses Prinzip des ligandendetektierenden NMR-Screenings wird ebenfalls in WO 98/48264 beschrieben.

Ein weiteres NMR-Relaxationsphänomen ist der Kern-Overhauser-Effekt (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE), bei dem Magnetisierung zwischen räumlich nahen Kernspins übertragen wird. Das Ausmaß des NOE hängt, außer vom Abstand der Kernspins und der gewählten Entwicklungsdauer, stark von der molekularen Beweglichkeit ab. Insbesondere wechselt das Vorzeichen des homonuklearen NOE (zwischen Protonen) beim Übergang von kleinen zu großen Molekülen. Ein kleiner Ligand verhält sich dabei im gebundenen Zustand wie das große *drug target* und nimmt nach seiner Dissoziation die temporär erworbene NOE-Intensität als sogenannten Transfer-NOE (*trNOE*) in den freien Zustand mit. Ein auch nur vorübergehend bindender Ligand kann folglich NMR-spektroskopisch dadurch von nicht bindenden kleinen Molekülen unterschieden werden, daß er im Gegensatz zu diesen auch *trNOE* mit umgekehrtem Vorzeichen aufweist. Dieses Prinzip ist Grundlage des in DE 19649359 beschriebenen und als *Bioaffinity NMR* publizierten Verfahrens (Meyer, Weimar et al.: *European Journal of Biochemistry* 1997, **246**, 705-709) zum ligandendetektierenden NMR-Screening.

Neben den beschriebenen *intramolekularen* NOE-Phänomenen zwischen Kernspins innerhalb desselben Moleküls (hier dem Ligand) kann Magnetisierung auch zwischen Kernspins des *drug targets* und Kernspins seines Liganden ausgetauscht werden. Ein solcher *intermolekularer* NOE kann prinzipiell sowohl auf dem Ligand als auch auf dem *drug target* beobachtet werden und ist ein unmittelbar zugänglicher, nicht primär von Änderungen molekularer Beweglichkeit beeinflusster lokaler Indikator der Ligandenbindung. Er ist beispielsweise Grundlage des ligandendetektierenden NMR-

Screenings über Sättigungs-Transfer-Differenz = STD (Klein, Meinecke et al.: *Journal of the American Chemical Society* 1999, **121**, 5336-5337; Mayer and Meyer: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 1999, **38**, 1784-1788), NOE-Pumping (Chen and Shapiro: *Journal of the American Chemical Society* 1998, **120**, 10258-10259; Chen and Shapiro: *Journal of the American Chemical Society* 2000, **122**, 414-415) und WaterLOGSY (Dalvit, Pevarello et al.: *Journal of Biomolecular NMR* 2000, **18**, 65-68).

Die intermolekulare Wechselwirkung zwischen den Kernspins eines Liganden und Elektronenspins eines paramagnetisch markierten drug targets ist Grundlage des SLAPSTIC-Verfahrens zum ligandendetektierenden NMR-Screening (Jahnke, Rüdissler et al.: *Journal of the American Chemical Society* 2001, **123**, 3149-3150). Diese Wechselwirkung führt zu einer extremen Beschleunigung der  $T_2$ -Relaxation und damit zur Auslöschung von NMR-Signalen nur derjenigen Liganden, die in der Nähe des paramagnetischen Labels am drug target binden. Das Nachweisprinzip ist den beschriebenen Relaxations-gefilterten Verfahren vergleichbar. Nachteilig ist jedoch die Notwendigkeit zur aufwändigen Markierung des drug targets sowie die Beschränkung des Nachweises auf lokalisierte Bindung in der Nähe der paramagnetischen Markierung.

Der größte Vorteil liganden-detektierter NMR-Screeningverfahren ist ihre potentiell hohe Durchsatzrate, da in der Regel nur sehr kurze Meßzeiten (wenige Minuten pro Probe) benötigt werden

Sämtliche bekannten liganden-detektierenden NMR-Screeningverfahren beobachten (d.h. messen den FID) auf Protonen, die jedoch ebenfalls mit großer Häufigkeit in allen drug target Molekülen vorliegen. Daraus ergibt sich das generelle und fundamentale Problem, innerhalb der Screening-Spektren die Reporter-Signale der Substanzen eindeutig, unmittelbar und einfach von den Hintergrund-Signalen des drug targets unterscheiden zu können. Hierfür werden in den bekannten Verfahren zwei prinzipielle, in der Praxis jedoch sehr unzureichende Methoden beschrieben. Zum einen kann man das Protonenspektrum des freien drug targets vom Screening-Spektrum subtrahieren. Allerdings ist diese Subtraktion aus grundsätzlichen Erwägungen nie vollständig, insbesondere nicht in Gegenwart bindender Liganden, die ja auch im Spektrum des drug targets Verschiebungen induzieren. Die einzige meßtechnische Möglichkeit der direkten Signalunterdrückung besteht im Einbau eines ( $T_2$ - oder  $T_{1\rho}$ -) Relaxationsfilters, der die Signale des weniger mobilen drug targets viel stärker unterdrückt als die Reporter-Signale der hochmobilen Testsubstanzen. Diese mobilitätsabhängige Selektion setzt jedoch voraus, daß die Testsubstanzen erheblich beweglicher als die drug target Moleküle sind und unterdrückt prinzipiell nicht nur das drug target, sondern auch den target-

gebundenen Zustand eines Liganden. Zwar kann der Bindungsnachweis im Prinzip immer noch indirekt über die Signalabnahme für die freie Form des Liganden erfolgen. Jedoch erfordert die verlässliche Erfassung von Signalintensitäten eine in der Praxis kaum erreichbare vollständige Unterdrückung der Hintergrund-Signale durch den Mobilitätsfilter, der insbesondere die Signale lokal flexibler Molekülbereiche des drug targets passieren läßt.

Das Problem der Signal-Unterdrückung der Resonanzen des drug targets kann auch auf elegante Weise gelöst werden, indem Liganden eingesetzt werden, die NMR-aktive Heterokerne tragen, die nicht oder nur in sehr geringer Häufigkeit im drug target vorkommen. Diese Liganden ermöglichen die Durchführung von NMR-Experimenten, bei denen auf den Heterokernen detektiert wird, oder die mit dem Heterokern gefiltert oder editiert werden. In den daraus resultierenden NMR-Spektren ist das Heterokern-freie drug target unsichtbar.

Ein Nachteil dieser Methode ist natürlich, daß die zu testenden Liganden den Heterokern tragen müssen. Dies schränkt die Auswahl der geeigneten Verbindungen drastisch ein und/oder erfordert einen zusätzlichen synthetischen Aufwand.

Die Eignung des Heterokerns  $^{19}\text{F}$  wird in diesem Zusammenhang in dem Artikel „NMR-Based Approaches for Lead Generation in Drug Discovery“ von J.W.Peng in *Methods of Enzymology*, Vol. 338 (2001), 202-230 und in der Veröffentlichung „Cross-Correlated Relaxation Measurements for the Study of Fluorinated Ligand-Receptor Interactions“ ebenfalls von J.W. Peng in *Journal of Magnetic Resonance* 153 (2001) 32-47 angedeutet. Keine dieser Veröffentlichungen beschreibt jedoch konkrete Ausführungsformen dieses Konzepts.

Diese Probleme umgehen die bekannten *target-detektierten Verfahren*, die bindungs-induzierte Veränderungen an Reporter-Signalen des drug targets aufzeigen und – da diese einzelnen Atomen des drug targets zuordenbar sind – unmittelbar Ort und Art der Ligandenbindung auf dem drug target erfassen. Die eindeutige Selektion der Reporter-Signale geschieht bei diesen Verfahren über eine NMR-spektroskopisch herbeigeführte magnetische Kopplung (Korrelation) mehrerer Kernspins innerhalb des drug target Moleküls, wie sie so für die niedermolekularen Testsubstanzen nicht möglich ist. Auf diese Weise werden zwei- oder höherdimensionale charakteristische *fingerprint*-Spektren aus Korrelationssignalen der drug targets erhalten, in denen (so gut wie) keine NMR-Signale der Testsubstanzen auftreten. Entscheidend ist, daß diese selektive Erfassung der Reporter-Signale sowohl im freien wie auch im liganden-assoziierten Zustand des drug

targets möglich ist, wodurch nunmehr auch hochaffine Liganden direkt beobachtet werden können. Als Indikator wird meist einfach eine bindungsinduzierte Verschiebung der Korrelationssignale erfaßt.

Als *fingerprint*-Spektren können im target-detektierten NMR-Screening einerseits homonukleare Korrelationsspektren mit zwei gekoppelten  $^1\text{H}$ -Dimensionen aufgenommen werden, wie in der **deutschen Patentanmeldung 101 60 177.8** (vom 07.12.2001) beschrieben. Andererseits können auch heteronukleare Korrelationsspektren gemessen werden, bei denen typischerweise die Frequenzen eines von Protonen verschiedenen Kerns in der indirekten Dimension mit den Frequenzen der direkt gebundenen Protonen in der direkt gemessenen Dimension korreliert werden. Die häufigsten Vertreter dieser Technik sind  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ - (**WO 97/18469**, **WO 97/18471**) und  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - (**WO 00/62074**) NMR-Korrelationsexperimente. Hierfür muß das drug target mit den NMR-detektierbaren stabilen Isotopen  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff bzw.  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff angereichert werden, da deren natürliche Häufigkeit (0.36% bzw. 1.1%) unzureichend für schnelle NMR-Spektroskopie ist. Das drug target wird durch diesen – gentechnisch einfach möglichen – *Isotopenaustausch* eindeutig markiert und vor den Testsubstanzen und dem Lösungsmittel ausgezeichnet. Die Isotopenmarkierung erlaubt also eine *hochaufgelöste spezifische und ausschließliche* Erfassung der gewünschten Reporter-Signale des drug targets in freier und assoziierter Form.

Den erwähnten Vorteilen target-detektierter NMR-Screeningverfahren – atomar aufgelöste unmittelbare Detektion und räumliche Zuordnung sowohl schwach als auch beliebig stark bindender Liganden – stehen jedoch im wesentlichen zwei Nachteile gegenüber. Einerseits werden die aufgenommenen Spektren des drug targets mit zunehmender Molekülgröße immer komplexer und aufgrund rascher Relaxationsphänomene immer intensitätsschwächer; immobilisierte oder unlösliche drug targets sind der NMR-Spektroskopie in Lösung kaum mehr zugänglich. Zum anderen ist die erzielbare effektive Durchsatzrate im Vergleich zu den o.a. liganden-detektierten NMR-Screeningverfahren erheblich niedriger, weil die erforderlichen mehrdimensionalen Spektren mehr Meßzeit benötigen.



### 3. Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung zum liganden-detektierten NMR-Screening hat zur Aufgabe, Verfahren zur NMR-basierten Wirkstoffsuche bereitzustellen, welche frei sind von den eingangs beschriebenen Nachteilen der bekannten Verfahren. Es wird insbesondere die Aufgabe behandelt, ein Verfahren bereitzustellen, welches maximale Durchsatzraten ermöglicht. Weiterhin hat die vorliegende Erfindung zur Aufgabe, Verfahren zur NMR-basierten Wirkstoffsuche bereitzustellen, welche eine erhöhte Sicherheit gegenüber falsch-positiven und/oder falsch-negativen Ergebnissen bietet.

Das erfindungsgemäße Verfahren überträgt hierzu das eingangs erwähnte Prinzip des target-detektierten Screenings auf das liganden-detektierte Screening, indem die herkömmliche Selektion der Ligandensignale nach Molekülgröße durch eine eindeutige und gänzlich größenunabhängige Selektion nach NMR-Frequenzen ersetzt wird. Der Ligand wird damit sowohl in freier (dissoziierter) als auch in gebundener (target-assoziiierter) Form selektiv beobachtbar.

Die vorliegende Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Zusammenstellung einer speziellen Bank, welche besonders auf die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit gesteigerten Durchsatzraten hin ausgerichtet ist. Diese Bank besteht ausschließlich aus Mischungen solcher Substanzen, die mit NMR-beobachtbaren Isotopen markiert sind, welche im drug target nicht oder nur mit sehr geringer Häufigkeit vorkommen. Die wesentlichen Merkmale dieses Verfahrens sind in Anspruch 1 aufgeführt. Die Unteransprüche 2 bis 5 beschreiben bevorzugte Ausführungsformen dieses Verfahrens. Es werden insbesondere Möglichkeiten aufgezeigt, wie derartige Substanzbanken mit *isotopenmarkierten Verbindungen* einfach und kostengünstig erhalten werden können, die unter Ausnutzung der einzigartigen Affinitäts-empfindlichkeit des NMR-Screening eine maximale chemische Vielfalt erschließen und als molekulare Bausteine gleichzeitig hohe pharmakologische Relevanz besitzen.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiterhin auf die Substanzbank gemäß Anspruch 6, die durch diese Verfahren erhältlich ist. Vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Substanzbank sind in den Unteransprüchen 7 bis 10 angegeben.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ligandendetektierte screening-Verfahren zur Wirkstoffsuche unter Verwendung der oben beschriebenen Substanzbank, die auf der Messung von Elementen oder Isotopen beruhen, die nicht (oder

nur in geringer Häufigkeit) im drug target vorliegen. Die wesentlichen Merkmale dieses Verfahrens sind in Anspruch 11 genannt, während die Unteransprüche 12 bis 17 besonders vorteilhafte Ausführungsformen dieses Verfahrens beschreiben. Ein alternatives Verfahren wird in den Ansprüchen 18 bis 21 genannt. Das der Erfindung zu Grunde liegende Problem der Steigerung der Durchsatzraten wird erfindungsgemäß durch die gleichzeitige Vermessung einer Vielzahl von Substanzen in den Gemischen der Substanzbank gelöst, welche ihrerseits erst durch die Vereinfachung der erhaltenen Spektren durch den Einsatz der Heterokerne ermöglicht wird.

Das erfindungsgemäße Screening-Verfahren kann unter Verwendung verschiedener NMR-Experimente durchgeführt werden, die die ligandenspezifischen Reporter-Signale der Isotopenmarker detektieren und daran einen oder mehrere der erwähnten Bindungsindikatoren sowohl im dissoziierten als auch im assoziierten Zustand erfassen. Die erhaltenen *heteronuklear editierten oder gefilterten* Screening-Spektren enthalten keine Störsignale unmarkierter Komponenten mehr. Damit wird erstmals das meßtechnisch überragende Problem der Wasserunterdrückung vollständig gelöst. Ebenso löst die vorliegende Erfindung das in der Spektrenauswertung überragende Problem störender Restsignale des drug targets, die bei den bisherigen Verfahren nur unvollständig unterdrückt werden. Die Screening-Spektren sind überdies von maximaler Einfachheit, da sie nur wenige Reporter-Signale pro Testsubstanz (entsprechend der Anzahl eingebauter Isotopenmarker) aufweisen. Bevorzugt ist die Verwendung von Substanzgemischen, bei denen jede Testsubstanz nur ein einziges Reporter-Signal erzeugt. Dies vereinfacht zum einen die automatisierte Spektrenauswertung und Identifizierung bindender Liganden. Die Übersichtlichkeit der Gemisch-Spektren erlaubt zum anderen die Zusammenstellung und eindeutige spektrale Unterscheidbarkeit von umfangreicheren Substanzgemischen und ist somit im Hinblick auf das der Erfindung zu Grunde liegende Problem als optimal einzustufen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht damit den bislang höchsten Durchsatz aller NMR-Screening-Verfahren, mit dem über 10.000 Substanzen pro Tag getestet und bindende Liganden unmittelbar identifiziert werden können.

#### 4. Beschreibung der Zeichnungen

**Figur 1.a** zeigt ein  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum der Submischung A ohne target-Protein (hellgrau, oben), mit Lysozym als Blindprobe (grau, Mitte) sowie mit  $\alpha\text{II}$ -Chymotrypsin als target-Protein (schwarz, unten).

**Figur 1.b** zeigt ein  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum der Submischung B ohne target-Protein (hellgrau, oben), mit Lysozym als Blindprobe (grau, Mitte) sowie mit  $\alpha\text{II}$ -Chymotrypsin als target-Protein (schwarz, unten).

**Figur 1.c** zeigt ein  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum der Submischung C ohne target-Protein (hellgrau), mit Lysozym als Blindprobe (grau) sowie mit  $\alpha\text{II}$ -Chymotrypsin als target-Protein (schwarz).

## 5. Ausführliche Beschreibung der Erfindung

### 5.1 Definitionen

Im folgenden wird unter einem *drug target* ein Molekül verstanden, dessen biologische Funktion und/oder Aktivität durch Wechselwirkung mit einem Liganden so verändert werden soll, daß eine bestimmte gewünschte Wirkung (z.B. die Therapie einer Krankheit) erzielt wird. Typische *drug targets* umfassen natürlich vorkommende Proteine, DNA- und/oder RNA-Moleküle. Derartige *drug targets* haben typischerweise ein deutlich größeres Molekulargewicht als die Testsubstanzen. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf solche *drug targets* beschränkt. Es ist sogar möglich, der NMR-Spektroskopie in Lösung nicht zugängliche (große oder immobilisierte) *drug targets* einzusetzen, da diese bei dem erfindungsgemäßen Verfahren des liganden-detektierten NMR-Screenings selber nicht erfaßt werden. Zur Durchführung des beschriebenen Verfahrens muß das *drug target* in ausreichender Menge (ca.  $10^2$  mg je 1000 zu testende Substanzen) und Reinheit dargestellt werden. Hierfür sind insbesondere gentechnisch veränderte mikrobielle Expressionssysteme geeignet. Die entsprechenden biochemischen Methoden sind dem Fachmann bekannt, insbesondere da für das erfindungsgemäß beanspruchte Verfahren des NMR-Screenings keine Isotopenmarkierung erforderlich ist.

Der Begriff *Ligand* bezeichnet eine chemische (*Test*)*Substanz*, die an das *drug target* bindet. Derartige Liganden sind typischerweise niedermolekulare chemische Verbindungen, die als Naturstoffe isoliert werden können oder über chemische Synthese zugänglich sind; die vorliegende Erfindung zur Suche nach Liganden (*Screening*) ist jedoch unabhängig von der Größe der zu testenden Substanzen.

Mit *Bindung* des Liganden an das *drug target* wird jede Wechselwirkung beider Moleküle bezeichnet, die ausreichend stark ist, um die NMR-Spektren des Liganden charakteristisch zu beeinflussen. Typischerweise können mit dem vorliegenden Verfahren Bindungen nachgewiesen werden, deren Dissoziationskonstante  $K_D$  zumindest im millimolaren Bereich liegen. Es besteht keine Affinitäts-Obergrenze.

Als *Isotopenmarker* oder *Heterokern* wird im Rahmen dieser Erfindung ein Element oder Isotop bezeichnet, welches NMR-spektroskopisch erfaßbar ist und in allen Molekülen der Testsubstanzen enthalten ist, während es im entsprechenden *drug target* nicht oder nur in so geringer natürlicher Häufigkeit (bevorzugt unter 5%, stärker bevorzugt unter 2%)

vorkommt, daß es beim erfindungsgemäßen Screening-Verfahren zu keinen beobachtbaren NMR-Signalen des drug targets führt. Diese Erfordernis kann auch erfüllt sein wenn das drug target zwar ebenfalls Isotopenmarker enthält, diese jedoch zu NMR-Signalen deutlich außerhalb des Frequenzbereiches der Isotopenmarker der Testverbindungen führen. Die Aufgabe der Isotopenmarker im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist dabei, ausschließlich für die Testsubstanzen NMR-beobachtbare *Reportersignale* zu liefern, die immer eine eindeutige Unterscheidung vom drug target ermöglichen. Der Begriff „Isotopenmarkierung“ impliziert nicht, daß die betreffende Markierung extra durch eine spezifische chemische Reaktion in die Verbindung eingeführt wird. Für die Ausführung der vorliegenden Erfindung ist es ebenso möglich, dass die Verbindung bereits mit dem Isotopenmarker neu hergestellt wird.

Unter einem *heteronuklearen* NMR-Experiment wird ein solches NMR-Experiment verstanden, bei dem entweder die Anregung der letztlich beobachtbaren NMR-Kohärenz auf einem *Heterokern* erfolgt, oder bei dem zumindest ein Kohärenz- oder Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen verschiedener Typen (unter Einschluß von mindestens einem Heterokern) erfolgt. Im Rahmen dieser Erfindung werden allerdings auch solche Protonen der Testsubstanzen wie Heterokerne behandelt und zusammen mit diesen unter dem Begriff *Isotopenmarker* zusammengefaßt, deren Signalfrequenzen deutlich außerhalb des Protonenspektrums des drug targets liegen. Die angeregte NMR-Kohärenz kann in Form eines *heteronuklear editierten* NMR-Spektrums erfaßt werden, in dem die Frequenzen der Heterokern-Signale (in vorliegender Erfindung als *Reportersignale* bezeichnet) direkt aufgezeichnet werden. Im Gegensatz dazu wird in einem *heteronuklear gefilterten* NMR-Experiment die heteronuklear angeregte NMR-Kohärenz auf koppelnde Protonen übertragen und auf diesen indirekt in Form eines selektierten Protonenspektrums erfaßt.

Unter *Meßbedingungen* werden im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung die bei der Aufnahme eines NMR-Spektrums gewählte Pulssequenz, die bei der Messung vorliegende Temperatur, das Lösungsmittel und der pH der zu messenden Lösung, sowie die bei der Messung verwendeten NMR-spektroskopischen Parameter (insbesondere Delays, Sendefrequenzen und Pulsleistungen) verstanden.

## 5.2 Verfahren zur Zusammenstellung der erfindungsgemäßen Substanzbank

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur *Zusammenstellung von Substanzen* nach den allgemeinen und speziellen Erfordernissen des erfindungsgemäßen Screening-Verfahrens. Dieses Verfahren umfasst die folgenden wesentlichen Schritte:

- (i) Auswahl einer Anzahl von Substanzen, die jeweils eine oder mehrere Isotopenmarker des selben Typs aufweisen;
- (ii) Bestimmung der NMR-Resonanzfrequenzen der Isotopenmarker der ausgewählten Substanzen;
- (iii) Gruppierung der ausgewählten Substanzen in eine oder mehrere Teilmenge(n), so daß innerhalb jeder Teilmenge sich die Signalfrequenz eines jeden Isotopenmarkers mindestens um das Doppelte der jeweiligen Breite des Signals auf halber Höhe (sogenannte Linien- oder Halbwertsbreite) von den Signalfrequenzen aller anderen Isotopenmarker innerhalb der Teilmenge unterscheidet (d.h. daß der Abstand benachbarter Signale größer als die Summe ihrer Halbwertsbreiten ist) und innerhalb jeder Teilmenge alle Signalfrequenzen der Isotopenmarker innerhalb eines spektralen Bereiches von 15 kHz fallen, mit der Maßgabe, daß die Substanzen jeder Teilmenge untereinander nicht reagieren;
- (iv) Herstellung von einem oder mehreren Substanzgemisch(en), wobei für jedes Substanzgemisch alle Substanzen der jeweiligen Teilmenge gemäß Schritt (iii) gemischt werden.

Die erfindungsgemäße Substanzbank ist eine Zusammenstellung einer großen Anzahl (beispielsweise über  $10^2$ , bevorzugt über  $10^3$ , stärker bevorzugt über  $5 \cdot 10^3$ ) an Substanzen, die in Form von Gemischen vorliegen. Die maximale Anzahl an Substanzen, die in der Substanzbank enthalten sein können, ist grundsätzlich nicht beschränkt. Aus finanziellen Gründen und aus Gründen der Praktikabilität wird die maximale Anzahl an Verbindungen in den meisten Fällen im Bereich von  $10^4$  bis  $10^6$  Substanzen liegen, wobei ein typischer Maximalwert bei  $10^5$  liegt. Die Verwendung von Gemischen ist im Hinblick auf den maximal möglichen Durchsatz an Substanzen in dem erfindungsgemäßen Screening-Verfahren ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung. Die Anzahl an Gemischen sollte so gering wie möglich gehalten werden. Die

erforderliche Mindestzahl an Gemischen richtet sich nach dem Quotienten aus der Gesamtzahl an Substanzen in der Substanzbank und der maximalen Anzahl an Substanzen, die in einem Gemisch vereint werden können ohne die wesentlichen Kriterien des oben genannten Teilschrittes (iii) zu verletzen. Bei einer Größe der Substanzbank von etwa  $10^4$  Verbindungen und einer Anzahl von 50 bis 100 Verbindungen pro Gemisch ergibt sich beispielsweise eine Anzahl von etwa 100 bis 200 Gemischen.

Es ist natürlich auch nicht ausgeschlossen, daß in den Gemischen neben den nach den oben beschriebenen Kriterien ausgesuchten Substanzen auch noch weitere Substanzen vorliegen, die beispielsweise einen anderen Isotopenmarker (z.B.  $^2\text{H}$  statt  $^{19}\text{F}$ ) tragen. Derartige zusätzliche Substanzen tragen zu dem erfindungsgemäßen Konzept der Erhöhung des Durchsatzes nicht bei, können jedoch zusätzliche Probleme verursachen, da sie

- die Wahrscheinlichkeit erhöhen, daß innerhalb der Gemische unerwünschte Reaktionen zwischen den Substanzen auftreten;
- Löslichkeitsprobleme in den Stocklösungen (s. Abschnitt 5.2.8 unten) verursachen können, da sie die Gesamtkonzentration an gelösten Substanzen in der Stocklösung erhöhen; und
- da sie das Risiko bergen, daß stark bindende Liganden innerhalb der Gruppe der zusätzlichen Substanzen schwach bindende Liganden aus der Gruppe der erfindungsgemäßen Substanzen verdrängen, so daß letztere nicht oder nur schlecht als Liganden identifiziert werden.

Diesen potenziellen Problemen steht lediglich ein geringer Zeitgewinn gegenüber, der dadurch entsteht, daß weitere Messungen an den zusätzlichen Substanzen durchgeführt werden können, ohne daß dazwischen ein Probenwechsel erforderlich ist (soweit der Probenkopf dies überhaupt zuläßt). Bei moderner Ausrüstung mit automatischem Probenwechsler oder Durchflußprobenkopf kann dieser Zeitgewinn jedoch die oben genannten potenziellen Probleme nicht kompensieren. Die Herstellung und Verwendung von Gemischen, in denen keine weiteren ausser nach den einleitend genannten Regeln ausgewählten Substanzen mit Isotopenmarker enthalten sind, ist daher im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt.

### 5.2.1 Allgemeine Voraussetzungen

Wie für ligandendetektierte NMR-Screeningverfahren allgemein gilt, müssen die Substanzen in wässriger Lösung über die Dauer eines Screening-Durchlaufes (> 1 Tag) chemisch stabil sein und dürfen im Gemisch nicht miteinander reagieren. Die NMR-Spektren von Gemischen geeigneter Substanzen (Gemischspektren) sollten auch keine Überlagerungen aufweisen, um die einzelnen Komponenten weiterhin unmittelbar spektral unterscheiden zu können. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn benachbarte Signalpositionen um mindestens das Doppelte der Summe ihrer Halbwertsbreiten auseinander liegen. Zur Aufnahme hinreichend intensiver NMR-Spektren innerhalb von kurzer Zeit sollten die Testsubstanzen in wässriger Lösung zu mindestens 0.05 mM, stärker bevorzugt 0.1 mM, besonders bevorzugt 0,2 mM löslich sein. Da das erfindungsgemäße Verfahren jedoch erstmals auch die selektive NMR-Beobachtung der Liganden im gebundenen Zustand erlaubt, gilt diese Löslichkeitsbedingung weniger streng: nunmehr müssen die Liganden entweder in wässriger Lösung (d.h. im freien Zustand) oder im Komplex mit dem drug target diese Mindestlöslichkeit erfüllen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß diese Mindestkonzentrationen in der Zukunft durch die Entwicklung und den Einsatz empfindlicherer Probenköpfe weiter gesenkt werden können. In diesem Falle erniedrigen sich natürlich auch die erforderlichen Mindestkonzentrationen in der DMSO-Stocklösung (s. Abschnitt 5.2.8 unten) entsprechend.

Als wesentliches Merkmal müssen die ausgewählten Testsubstanzen jeweils mindestens einen *Isotopenmarker* enthalten, d.h. einen Kern eines Elementes oder Isotopes, der NMR-spektroskopisch beobachtbar ist und im drug target nicht bzw. nur mit sehr viel geringerer (bevorzugt weniger als 5%, stärker bevorzugt weniger als 2%) Häufigkeit vorkommt, oder der ein NMR-Signal deutlich außerhalb des Frequenzbereiches gleichartiger Elemente oder Isotope im drug target liefert. Aus NMR-spektroskopischer Sicht sind dabei besonders Kerne mit hoher NMR-Empfindlichkeit und spektraler Dispersion vorteilhaft, die zu intensiven und gut aufgelösten *Reportersignalen* führen.

Weiterhin müssen alle Testsubstanzen der Substanzbank den selben Isotopenmarker aufweisen.

Es ist bevorzugt, wenn möglichst wenige Reportersignale pro Testverbindung vorliegen, um NMR-Spektren minimaler Komplexität zu erhalten. Die Anzahl erhaltener Reportersignale ist dabei gleich der Anzahl Isotopenmarker bzw. magnetisch äquivalenter Isotopenmarker (z.B. in CX<sub>3</sub>-Einheiten). Besonders bevorzugt sind Testverbindungen, die



nur ein einziges Reportersignal liefern. So können maximal umfangreiche Substanzmischungen (beispielsweise mit bis zu 100 oder 150 Verbindungen) ohne Überlagerungen in ihren Gemisch-Spektren zusammengestellt werden, die dann im erfindungsgemäßen NMR-Screeningverfahren direkt eingesetzt und unmittelbar nach den einzelnen Komponenten unterschieden werden können. Die Durchsatzraten werden so um mindestens eine Zehnerpotenz gegenüber herkömmlichen NMR-Screeningverfahren erhöht. Eine minimale Anzahl Isotopenmarker erschwert zwar die Erkennung von Ligandenbindung über *lokale* Effekte (wie Verschiebung der Signalfrequenz oder direktem intermolekularen Magnetisierungstransfer zwischen Ligand und drug target). Die daraus resultierende Gefahr falsch-negativer Anzeige wird aber durch die (gleichzeitige) Erfassung der Ligandenbindung über *globale* Effekte (wie diffusions- oder relaxationsmodulierte Signalintensitäten) aufgehoben, welche ohne größeren Meßaufwand an beliebiger Position im Liganden ermittelt werden können. Sollen jedoch primär *lokale* Bindungseffekte erfaßt werden, ist eine möglichst hohe Verteilung der Isotopenmarker im Liganden vorteilhaft.

Die Isotopenmarkierung der zumeist synthetischen, nicht-biogenen Testsubstanzen ist schwieriger als die mittlerweile fast routinemäßig durchgeführte gentechnische Isotopenmarkierung der drug targets mit den NMR-aktiven Kernen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  oder  $^2\text{H}$  (Goto and Kay: *Current Opinion in Structural Biology* 2000, 10, 55-592). Insbesondere ist ein allgemeiner Isotopenaustausch – beispielsweise des überwiegenden, NMR-unsichtbaren  $^{12}\text{C}$  Kohlenstoffs (mit 99% natürlicher Häufigkeit) gegen das seltene, NMR-spektroskopierbare  $^{13}\text{C}$  Isotop – synthetisch nur schwer durchführbar. Es gibt aber eine Reihe von Methoden, auf dem Weg chemischer Derivatisierung NMR-aktive Kerne an die Testsubstanzen als Isotopenmarker *anzuhängen*.

Während der Isotopenmarker als Lieferant des NMR-Reporter-Signales essentiell für das erfindungsgemäße Verfahren ist, sind an die Substanzbank zur erfolgreichen Wirkstoffsuche noch weitere allgemeingültige Anforderungen zu stellen. Vor allem sollte sie eine möglichst große chemische Vielfalt abdecken, um die Trefferwahrscheinlichkeit des NMR-Screeningverfahrens zu erhöhen. Die Empfindlichkeit des Screeningverfahrens hinsichtlich der minimalen erfaßbaren Bindungsstärke ist beim NMR-Screening unübertroffen hoch. Daher müssen die aufzufindenden Liganden bei weitem nicht so exakt in ihre komplementäre Bindungstasche am drug target passen, wie für eine Trefferanzeige bei den unempfindlicheren Hochdurchsatz-Screeningmethoden (HTS) erforderlich ist. Der chemisch-strukturelle Raum muß deshalb durch eine für das NMR-Screening optimierte Substanzbank weniger dicht abgedeckt werden. Die Substanzbank

kann auf eine erheblich geringere Anzahl ( $10^3 - 10^5$  Verbindungen) einfacher chemischer Grundgerüste beschränkt werden, die im allgemeinen zwar weniger stark, dafür aber mit höherer Wahrscheinlichkeit an ein vorgegebenes drug target binden. Im Gegensatz zu komplexeren Verbindungen können diese einfachen Grundmotive käuflich erworben oder durch chemische Synthese leicht mit bestimmten Isotopenmarkern hergestellt werden. Damit ist das Problem der Zugänglichkeit einer für das NMR-Screening ausreichenden chemischen Vielfalt mit isotopenmarkierten Verbindungen gut lösbar.

Ein mögliches Problem ist die Beeinflussung der pharmakologischen oder bindungs-chemischen Eigenschaften eines Liganden durch den Isotopenmarker. Falls der Isotopenmarker nur *temporär* eingebaut wird und im medizinisch-chemischen Optimierungsprozeß wieder entfernt werden soll, sind die pharmakologischen Eigenschaften (z.B. Toxizität, Bioverfügbarkeit etc.) des Isotopenmarkers irrelevant. Wichtig ist dann jedoch, daß der Isotopenmarker die Ligandenbindung an das drug target nicht wesentlich beeinflußt, so daß die Affinität zwischen drug target und Ligand auch bei der nachträglichen Entfernung des Isotopenmarkers erhalten bleibt. Verbleibt der Isotopenmarker *permanent* im Liganden, so sind ausschließlich seine pharmakologischen Eigenschaften relevant.

### 5.2.2 Fluor als Isotopenmarker

In einer besonders bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Isotopenmarker das Element *Fluor* benutzt und entsprechend eine Substanzbank aus fluorhaltigen Verbindungen zum Zwecke des Fluor-detektierten NMR-Screenings zusammengestellt. Das Element Fluor liegt mit 100% natürlicher Häufigkeit in Form des hervorragend NMR-zugänglichen Isotopes  $^{19}\text{F}$  vor und ist überdies in praktisch keiner bekannten biogenen Substanz und damit auch in praktisch keinem bekannten drug target vorhanden. Gleichzeitig sind mehrere Zehntausend fluorierte Substanzen kommerziell erhältlich, mit denen die für effektives  $^{19}\text{F}$ -NMR-Screening notwendige chemische Vielfalt abgebildet werden kann. Fluorierte Verbindungen besitzen überdies überdurchschnittlich günstige pharmakologische Eigenschaften, weshalb  $^{19}\text{F}$  meist als permanenter Isotopenmarker verbleiben kann. So werden z.B. aromatische Wirkstoff-Kandidaten bei der medizinisch-chemischen Optimierung bevorzugt in para-Stellung fluoriert, um ihren raschen cytochromatischen Abbau zu blockieren. Auch als nur temporärer Isotopenmarker ist  $^{19}\text{F}$  besonders geeignet, da das Atom nahezu isoster (gleich groß) zu Wasserstoff ist und sich die chemischen Eigenschaften einer Verbindung nach Austausch von  $^{19}\text{F}$  durch  $^1\text{H}$  meist nur marginal ändern. Hinsichtlich seiner NMR-

spektroskopischen Eigenschaften ist der Spin- $1/2$ -Kern  $^{19}\text{F}$  mit 83% relativer Empfindlichkeit dem Proton  $^1\text{H}$  nahezu gleichwertig. Bei vergleichbaren Linienbreiten und Signalintensitäten ist die spektrale Dispersion für  $^{19}\text{F}$  hingegen ca. 30fach größer als für  $^1\text{H}$ . Daher können erheblich umfangreichere Substanzmischungen (beispielsweise mit bis zu 100 bis 150 Verbindungen) ohne Überlagerungen in ihren Gemisch-Spektren im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Screening eingesetzt und unmittelbar unterschieden werden, was die Durchsatzraten um mindestens eine Zehnerpotenz gegenüber herkömmlichen (protonendetektierenden) NMR-Screeningverfahren erhöht. Zusätzlich reagieren die Signalfrequenzen von  $^{19}\text{F}$  gegenüber  $^1\text{H}$  ca. 30fach empfindlicher auf Veränderungen der lokalen chemischen Umgebung und können bindungsinduzierte Effekte daher auch noch in erheblich größerer Entfernung registrieren. Für die bevorzugt eingesetzten kleinen chemischen Grundgerüste reicht so oftmals bereits ein einziger  $^{19}\text{F}$ -Kern aus, um selbst anhand des *lokalen* Indikators Signalfrequenz eine Ligandenbindung verlässlich erfassen zu können.

### 5.2.3 Deuterium als Isotopenmarker

In einer weiteren bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Isotopenmarker das Wasserstoff-Isotop Deuterium ( $^2\text{H}$ ) benutzt und entsprechend eine Substanzbank aus deuteriumhaltigen Verbindungen zum Zwecke des  $^2\text{H}$ -detektierten NMR-Screenings zusammengestellt. Deuterium ist mit nur 0.015% natürlicher Häufigkeit in allen biogenen Verbindungen und drug targets praktisch nicht nachweisbar. Im Gegensatz zu fluorierten Verbindungen sind deuterierte Verbindungen jedoch nicht in der erforderlichen Vielfalt kommerziell erhältlich. Allerdings ist der gezielte Einbau von Deuterium mittels chemischer Syntheseverfahren breit möglich und kann die erforderliche chemische Vielfalt gut abdecken. Als Beispiel sei die Zugänglichkeit über kommerziell erhältliche halogenierte Verbindungen (Chlor-, Brom- oder Iod-haltige Verbindungen) durch Umsetzung zu den entsprechenden Grignard-Salzen und Aufnahme in schwerem Wasser ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) genannt (Jerry March: *Advanced Organic Chemistry*; Wiley-Interscience, ISBN 0-471-85472-7; H. Beyer, W. Walter: *Lehrbuch der Organischen Chemie*; S. Hirzel Verlag Stuttgart; ISBN 3-7776-0406-2). Bindungsschemische und pharmakologische Eigenschaften sind für die Isotope  $^2\text{H}$  und  $^1\text{H}$  identisch, so daß Deuterium als permanenter wie auch als jederzeit gegen  $^1\text{H}$  austauschbarer temporärer Isotopenmarker verwendet werden kann. Deuterium weist nur ca. 1% der NMR-Empfindlichkeit von  $^1\text{H}$  auf, die jedoch immer noch für hinreichend schnelles  $^2\text{H}$ -detektiertes NMR-Screening ausreichend ist. Spektrale Dispersion (in ppm) und chemische Verschiebung (in ppm) sind für die Isotope  $^1\text{H}$  und  $^2\text{H}$  gleich. Im Unterschied

zu  $^1\text{H}$  ist  $^2\text{H}$  jedoch ein Quadrupol-Kern ( $\text{Spin} = 1$ ), dessen Relaxation viel empfindlicher auf Änderungen der lokalen chemischen Umgebung reagiert als bei einem Spin- $1/2$ -Kern wie dem Proton. Insofern werden Signalintensität und -breite als Bindungsindikatoren aussagekräftiger bzw. relaxationsgefilterte  $^2\text{H}$ -NMR-Messungen gegenüber  $^1\text{H}$  effizienter.

#### 5.2.4 Tritium als Isotopenmarker

Die erfindungsgemäßen Verfahren können auch unter Benutzung des dritten Wasserstoff-Isotops, Tritium ( $^3\text{H}$ ), als Isotopenmarker angewendet werden. Die Ausführungen zum Wasserstoff-Isotop  $^2\text{H}$  gelten entsprechend. Die NMR-Eigenschaften dieses Spin- $1/2$ -Kernes sind jedoch dem Proton viel ähnlicher. Es ist jedoch zu beachten, daß Tritium radioaktiv ist, so daß dessen Verwendung einen hohen sicherheitstechnischen Aufwand erfordert.

#### 5.2.5 $^{13}\text{C}$ als Isotopenmarker

In einer weiteren bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Isotopenmarker das Kohlenstoff-Isotop  $^{13}\text{C}$  benutzt und entsprechend eine Substanzbank aus  $^{13}\text{C}$ -haltigen Verbindungen zum Zwecke des direkt  $^{13}\text{C}$ -detektierten oder indirekt  $^{13}\text{C}$ -gefilterten/ $^1\text{H}$ -detektierten NMR-Screenings zusammengestellt.  $^{13}\text{C}$  ist mit nur 1.1% natürlicher Häufigkeit in allen biogenen Verbindungen und drug targets wie auch  $^2\text{H}$  praktisch nicht nachweisbar. Kommerziell sind  $^{13}\text{C}$ -markierte Verbindungen allerdings recht teuer und nur mit geringer chemischer Vielfalt erhältlich. Jedoch bestehen auch hier vielfältige Möglichkeiten,  $^{13}\text{C}$  mittels chemischer Syntheseverfahren einzuführen. Beispielsweise kann kommerziell erhältlicher  $^{13}\text{C}$ -Methylalkohol über gängige Veresterungs- und Veretherungsreaktionen eingebaut werden (Jerry March: *Advanced Organic Chemistry*, Wiley-Interscience, ISBN 0-471-85472-7; H. Beyer, W. Walter: *Lehrbuch der Organischen Chemie*; S. Hirzel Verlag Stuttgart; ISBN 3-7776-0406-2). Bindungsschemische und pharmakologische Eigenschaften sind für die Isotope  $^{13}\text{C}$  und  $^{12}\text{C}$  identisch, so daß  $^{13}\text{C}$  als permanenter wie auch als jederzeit gegen  $^{12}\text{C}$  austauschbarer temporärer Isotopenmarker verwendet werden kann.  $^{13}\text{C}$  ist ein NMR-spektroskopisch sehr gut meßbarer Spin- $1/2$ -Kern. Die relative NMR-Empfindlichkeit von 1.6% (bzgl.  $^1\text{H}$ ) ist ausreichend für schnelles  $^{13}\text{C}$ -detektiertes NMR-Screening. Sie kann noch deutlich erhöht werden, wenn auf  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen beobachtet, d.h.  $^{13}\text{C}$ -gefiltert/ $^1\text{H}$ -detektiert gemessen wird (diese *indirekten* Isotop-gefilterten Meßmethoden sind allgemein gangbar, wenn das Isotop direkt an ein Proton gebunden ist). Bei direkt  $^{13}\text{C}$ -

detektierendem NMR-Screening wirkt sich allerdings die gegenüber  $^1\text{H}$  ca. 20fach größere spektrale Dispersion insbesondere vorteilhaft auf die maximal mögliche Anzahl an Testsubstanzen aus, die ohne Überlappung ihrer Reportersignale im Gemisch vorliegen können. Dies ermöglicht eine weitere Steigerung der Durchsatzraten, wie bereits für  $^{19}\text{F}$ -detektiertes NMR-Screening beschrieben.

#### 5.2.6 $^{31}\text{P}$ als Isotopenmarker

In einer weiteren Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Isotopenmarker das Element Phosphor benutzt und entsprechend eine Substanzbank aus phosphorhaltigen Verbindungen zum Zwecke des phosphor-detektierten NMR-Screenings zusammengestellt. Das Element Phosphor liegt mit 100% natürlicher Häufigkeit in Form des gut NMR-zugänglichen Isotopes  $^{31}\text{P}$  vor, kommt jedoch auch häufig in drug targets vor (z.B. in phosphorylierten Proteinen sowie in DNA und RNA). Allerdings ist hier der NMR-Spektralbereich relativ eng umgrenzt und kann u.U. gut von den  $^{31}\text{P}$ -Signalen phosphorhaltiger Testsubstanzen unterschieden werden. Während die NMR-Eigenschaften des Spin- $1/2$ -Kernes  $^{31}\text{P}$  günstig sind (6.6% der NMR-Empfindlichkeit von  $^1\text{H}$ , jedoch eine ca. 40fach größere spektrale Dispersion), ist die Zugänglichkeit einer breiten chemischen Vielfalt phosphorhaltiger Verbindungen problematisch. Wegen des oft deutlichen Einflusses auf die Bindungseigenschaften eignet sich Phosphor meist nur als permanenter Isotopenmarker. Eine allgemeine Aussage über die pharmakologischen Eigenschaften kann angesichts der sehr geringen Zahl bekannter phosphorhaltiger Wirkstoffe nicht gemacht werden.  $^{31}\text{P}$ -detektierte NMR-Spektroskopie nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ist demnach insbesondere in Einzelfällen mit spezialisierten Substanzbanken sinnvoll.

#### 5.2.7 Weitere Isotopenmarker

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch mit weiteren NMR-observablen Isotopenmarkern durchgeführt werden. Eine Liste weiterer observabler Isotopenmarker kann z.B. dem BRUKER-Almanac der Firma BRUKER Biospin GmbH ([nmr@bruker.de](mailto:nmr@bruker.de)) entnommen werden.

#### 5.2.8 Herstellung von Stocklösungen

Die derart ausgewählten Testsubstanzen werden bevorzugt hochkonzentriert in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst bereitgestellt, in dem sie allgemein sehr gut löslich und haltbar sind.

### 5.2.9 Herstellung von Substanzgemischen

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Testsubstanzen nicht einzeln, sondern bereits als *Gemisch-Stocklösungen* bereitgestellt, in denen die Komponenten einheitlich bevorzugt mindestens 0.05 M (stärker bevorzugt 0.1 M) Konzentration aufweisen sollten damit ihre spätere Zugabe zur wäßrigen Lösung des drug targets mit möglichst kleinem Volumen erfolgen kann; dies ist nötig, da oberhalb von etwa 5 bis 10 Volumenprozent DMSO-Anteil strukturelle Veränderungen des drug target Proteins eintreten können. Dies erleichtert die Screening-Routine erheblich, wobei das Screening von Substanzgemischen nicht nur zu einem erhöhten Probendurchsatz, sondern auch aus – nachfolgend noch näher erläuterten - Gründen im Hinblick auf die Spektrenstandardisierung von Vorteil ist. Bei der Zusammenstellung dieser Gemisch-Stocklösungen ist selbstverständlich darauf zu achten, daß die Komponenten nicht untereinander reagieren. Die Reporter-Signale der Komponenten dürfen sich ferner nicht überlagern, um weiterhin deren eindeutige und direkte spektrale Unterscheidung zu ermöglichen. Aufgrund prinzipieller NMR-methodischer Probleme bei der homogenen Breitband-Anregung sollten die Mischungen zuletzt derart zusammengestellt sein, daß alle enthaltenen Reporter-Signale innerhalb eines spektralen Bereiches fallen, der von der maximalen Anregungsbreite des bei dem screening-Verfahren verwendeten NMR-Experiments abgedeckt wird (mit den derzeit verfügbaren Pulsprofilen sind dies maximal ca. 15 kHz; es ist jedoch nicht auszuschließen, daß im Rahmen zukünftiger Weiterentwicklungen von Hardware und der Entwicklung weiterer, verbesserter Pulsprofile die erzielbaren maximalen Anregungsbreiten über 15 kHz liegen werden; in diesem Falle ist natürlich möglich, im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Zusammenstellung der Mischung den verfügbaren Anregungsbreiten anzupassen). Die Reporter-Signale innerhalb eines Substanzgemisches sollten daher in einem spektralen Bereich von weniger als 15 kHz, bevorzugt von weniger als 10 kHz, liegen. Diese Bedingung ist insbesondere für den Isotopenmarker  $^{19}\text{F}$  zu beachten, dessen bekannte spektrale Dispersion bei über 150 kHz liegt (entsprechend 300 ppm bei 500 MHz Feldstärke). Unter Berücksichtigung der genannten Kriterien (ausreichende Löslichkeit, keine Signalüberlappung und spektrale Dispersion geringer als ca. 15 kHz) können Gemisch-Stocklösungen mit beispielsweise bis zu 100 bis 150 Komponenten zusammengestellt und unmittelbar im NMR-Screening eingesetzt werden. Natürlich bedingt das Erfordernis der Stabilität der Stocklösungen auch, daß die Verbindungen innerhalb jedes Gemisches nicht miteinander reagieren. Als Test für dieses Kriterium kann ein Vergleich der NMR-Spektren des Gemisches über einen bestimmten Zeitraum dienen: Die Gemische weisen eine ausreichende Stabilität auf wenn sich das NMR-

Spektrum der Mischung über einen Zeitraum von mindestens einem Tag (bevorzugt: ein Monat, stärker bevorzugt: ein Jahr) nicht wesentlich ändert (d.h. daß keine Signalreduktionen über 10% (bevorzugt 5%) und keine neuen Signale von mehr als 5% (bevorzugt: 2%) der Intensität der jeweiligen Reportersignale auftreten). Im Hinblick auf die erfindungsgemäße Aufgabe der Steigerung des Durchsatzes an gemessenen Verbindungen ist es bevorzugt, Mischungen herzustellen, die mindestens 10 (bevorzugt mindestens 20, stärker bevorzugt mindestens 50) Substanzen enthalten. Limitierende Faktoren für die maximale Anzahl an Verbindungen in einem Gemisch sind Signalüberlappung, spektrale Breite und Reaktivität der enthaltenen Substanzen.

### 5.3 Die erfindungsgemäße Substanzbank

Die erfindungsgemäße Substanzbank betrifft eine Zusammenstellung von Substanzen, die die obengenannten Erfordernisse erfüllt und die daher für die Durchführung des im folgenden beschriebenen screening-Verfahrens geeignet ist.

### 5.4 Das erfindungsgemäße Screening-Verfahren

Das erfindungsgemäße Screening-Verfahren umfasst in seiner bevorzugten Ausführungsform die folgenden Schritte:

- (A) Aufnahme eines nach dem vorliegenden Isotopenmarker editierten oder gefilterten Referenzspektrums einer Substanzmischung aus der Substanzbank gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10;
- (B) Herstellung einer Mischung aus dem drug target und der Substanz oder Substanzmischung nach Schritt (A);
- (C) Aufnahme eines Screeningspektrums der in Schritt (B) hergestellten Mischung unter den Meßbedingungen aus Schritt (A);
- (D) Identifizierung bindender Liganden durch Vergleich des Screeningspektrums mit dem Referenzspektrum anhand von Veränderungen der NMR Signale oder des NMR Signals der oder des bindenden Liganden.

#### 5.4.1 Aufnahme des Referenzspektrums (Schritt A)

Die *Aufnahme des Referenzspektrums* einer Substanzmischung in Schritt A des erfindungsgemäßen screening-Verfahrens wird in der Regel *vor* Zugabe zum drug target durchgeführt, so daß zwischen Referenz- und Screeningspektrum ein Probenwechsel erforderlich ist. Die Probenbedingungen – vor allem pH-Wert, Temperatur, Lösungsmittel, Proben- und Salzkonzentration – sollten dabei möglichst exakt übereinstimmen, da sie andernfalls Bindungsindikatoren ungewünscht beeinflussen und somit zu falsch-positiver Anzeige führen können. Diese Gefahr droht insbesondere für die hochempfindlichen NMR-Signalfrequenzen als Indikator. Für das erfindungsgemäße Verfahren werden die Testsubstanzen zwecks Aufnahme der Referenzspektren daher generell in verdünnter, wäßriger Lösung unter Screening-Bedingungen vermessen, d.h. bei gleicher Temperatur und Konzentration in derselben Pufferlösung, in der auch das drug target beim späteren Screening gelöst wird.

Erfindungsgemäß werden die Referenzspektren nicht für Einzelsubstanzen, sondern für die nach o.a. Kriterien zusammengestellten Substanzmischungen aufgenommen. Hierzu wird durch entsprechende Zugabe der DMSO-haltigen Gemisch-Stocklösung zur wäßrigen Pufferlösung eine Substanzkonzentration eingestellt, wie sie später auch für das Screening gelten soll (in der Regel im Bereich  $10^{-1}$  bis  $10^0$  mM). Dabei reicht meist eine nur größenordnungsmäßig gleiche Konzentrationseinstellung, da dieser Parameter die NMR-Indikatoren in der Regel wenig beeinflusst. Wie erwähnt sollte die DMSO-Zugabe 5 Volumenprozent jedoch nicht überschreiten und eine Ausfällung der Substanz vermieden werden. Die Auswirkung von Konzentrationsänderungen auf die Referenzspektren kann durch eine Titrationsreihe ermittelt werden. Die Pufferkonzentration muß ausreichend hoch sein, um pH-Änderungen durch saure oder basische Reaktion der Substanzmischung sowie des drug targets auffangen zu können. Unter Umständen begrenzt die Pufferkapazität mögliche Größe und Zugabe der Substanzgemische. Großen Einfluß auf die NMR-Indikatoren hat in der Regel die Meßtemperatur, die daher für Referenz- und Screeningspektren übereinstimmen muß. Die bei der Referenzmessung und bei der screening-Messung vorherrschenden Temperaturen sollten sich daher um nicht mehr als 1K unterscheiden.

Der besondere Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens der Vermessung von Substanzgemischen ist neben dem Zeitgewinn die Tatsache, daß Referenzspektren von Substanzgemischen inhärent standardisiert sind. So können neben absoluten auch relative



Signalfrequenzen ermittelt werden. Das Signal einer Testsubstanz wird somit durch seine Position relativ zu den Signalen der anderen Testsubstanzen im Gemisch standardisiert. Insbesondere ist aber auch die Standardisierung relativer *Signalintensitäten* möglich, die als Bindungsindikatoren in der Praxis meist höhere Bedeutung haben. Die relative Standardisierung von Signalfrequenzen und –intensitäten wird umso verlässlicher, je umfangreicher die Substanzgemische sind.

In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Screening-Verfahrens können den Substanzmischungen auch zusätzliche Standards für (relative) Signalfrequenzen und –intensitäten hinzugefügt werden. Als Standard ist jede Substanz geeignet, die ausreichend wasserlöslich ist und nicht mit dem drug target wechselwirkt, damit also möglichst einfach und ohne funktionale Gruppen aufgebaut ist. Für das  $^{19}\text{F}$ -detektierte NMR-Screening wären somit beispielsweise TFE (Trifluorethanol), TFA (Trifluoressigsäure) oder Hexafluorbenzol geeignete Standards.

Bei der wiederholten Durchführung des erfindungsgemäßen Screening-Verfahrens auf verschiedenen drug targets ist es besonders vorteilhaft, das NMR-Screening immer bei gleicher Meßtemperatur, pH-Wert und Pufferkonzentration durchzuführen, um nicht jedesmal erneut Referenzspektren aufnehmen zu müssen. Dies ist in der Tat für eine große Anzahl verschiedener drug targets möglich, die um Raumtemperatur (298K) und pH = 7 (bevorzugt in > 50mM Phosphatpuffer) stabil und funktional sind. Es ist dennoch empfehlenswert, pH- und Temperaturabhängigkeit der Referenzspektren einmal durch entsprechende Variation dieser Parameter zu ermitteln. Weiterhin sollte auch die Langzeit-Stabilität der Gemisch-Stocklösungen durch spätere Nachmessungen überprüft werden.

Die Aufnahme des Referenzspektrums sollte mit demselben NMR-Experiment und denselben Meßparametern erfolgen wie für das Screeningspektrum. Sie wird dort ausführlich beschrieben.

#### 5.4.2 Zugabe der Testsubstanzen zum drug target (Schritt B)

Die *Zugabe der Testsubstanzen zur Lösung des drug targets* (Schritt B) erfolgt bevorzugt in Form einer entsprechenden Menge der Gemisch-Stocklösung bis zu maximal ca. 5 Volumenprozent DMSO-Gehalt. In dieser *Screening-Mischung* soll die Konzentration jeder Substanz unter derjenigen des drug targets liegen, da ein Ligandenüberschuß das Verhältnis aus gebundener zu freier Spezies und damit meist den Ausschlag des Bindungsindikators reduziert. Außerdem verbleibt nur im Unterschuß auch in Gegenwart

eines stark bindenden Liganden genug freies drug target zum Nachweis konkurrierender schwächerer Liganden. Viele Testsubstanzen sind in wäßriger Lösung ohnehin schwerer löslich als das drug target. Die Substanzkonzentration wird also nach oben durch die Eigenlöslichkeit bzw. die Löslichkeit des drug targets, nach unten durch die benötigte Meßdauer zur Aufnahme hinreichend intensiver NMR-Spektren begrenzt. Bevorzugt ist eine minimale Konzentration von 0.1 mM, die die Messung ausreichend intensiver eindimensionaler Spektren der heteronuklearen Isotopenmarker innerhalb von 5 Minuten ermöglicht. Der Einsatz hochempfindlicher Kryo-Meßköpfe kann die Konzentrations-Untergrenze auf unter 0.05 mM senken.

#### 5.4.3 Aufnahme des Screeningspektrums (Schritt C)

##### 5.4.3.1 Allgemeines

Zur *Aufnahme des Screeningspektrums* (Schritt C) wird ein nach dem vorliegenden Isotopenmarker editiertes oder gefiltertes NMR-Experiment an der Screening-Mischung durchgeführt, das geeignet ist, die NMR-Indikatoren Signalfrequenz und (bindungsmodulierte) Signalintensität auf den Reportersignalen aufzuzeichnen. Während die Signalfrequenz prinzipiell aus jedem denkbaren NMR-Experiment erhältlich ist, kann die Signalintensität mittels verschiedener NMR-Experimente von unterschiedlichen bindungsabhängigen Phänomenen (wie z.B. Diffusion, Relaxation oder Magnetisierungs-transfer) moduliert werden.

Signalintensitäten unterliegen wie Signalfrequenzen dem Einfluß mehrerer Parameter, sind jedoch im Gegensatz zu letzteren weniger von Probenbedingungen als vielmehr von Meßparametern abhängig. Insofern muß primär meßtechnisch gewährleistet werden, daß die Modulation der Signalintensitäten von den gewünschten bindungsabhängigen Effekten dominiert wird. Bei den NMR-Screeningtechniken des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Anregung auf den Isotopenmarkern, die teilweise lange enthalpische  $T_1$ -Relaxationszeiten aufweisen können. Bei rascher Abfolge der Scans eines NMR-Experimentes kann es daher zu unterschiedlicher Sättigung der Reportersignale kommen, die vom Ausmaß der Anregung und der *Inter-scan*-Wartezeit abhängt. Partielle Sättigung verfälscht die Signalintensitäten und muß durch kleine Anregungspulswinkel oder ausreichend lange *Inter-scan*-Wartezeiten minimiert werden, die mindestens das Dreifache der längsten  $T_1$ -Relaxationszeit betragen sollten.  $T_1$ -Relaxationszeiten können vom Fachmann schnell durch *Inversion-Recovery* Experimente

(Bodenhausen: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 1981, 14, 137ff) einmalig an der reinen Substanzmischung bestimmt werden. In der Praxis dürfte eine *Interscan*-Wartezeit von 2-3 Sekunden meist ausreichen.

#### 5.4.3.2 Einsatz inverser, heteronuklear gefilterter Experimente

In einer alternativen Ausführungsform der nachfolgend beschriebenen *heteronuklear editierten* Experimente mit direkter Beobachtung und Frequenzaufzeichnung der Isotopenmarker kann auch nach diesen *selektiert* werden, falls der Isotopenmarker stark mit Protonen koppelt, wie beispielsweise  $^{13}\text{C}$  zu direkt gebundenen  $^1\text{H}$ . In diesem Fall wird indirekt auf den skalar gekoppelten Protonen detektiert. Die NMR-Module zum Selektieren von Heterokernen (sog. Isotopenfilter) sind dem Fachmann geläufig (Breeze: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2000, 36, 323-372). Vorteil dieses Verfahrens ist die Ausnutzung der meist erheblich höheren NMR-Empfindlichkeit sowie der u.U. günstigeren Relaxationseigenschaften der Protonen gegenüber dem Isotopenmarker. Problematisch sind jedoch die notwendige Unterdrückung des intensiven Wassersignals sowie die geringere Dispersion und hohe Überlagerung im *homonuklearen* (Gemisch-) Protonenspektrum. Bei starker Kopplung sollte im übrigen immer der nicht beobachtete Kern entkoppelt werden.

#### 5.4.3.3 Basisexperiment

In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das einfachste denkbare NMR-Experiment, bestehend aus nur einem Anregungspuls für die Isotopenmarker, zur Generierung eines eindimensionalen Spektrums der heteronuklearen Reportersignale durchgeführt. Dieses Experiment besitzt naturgemäß die größte Anregungsbreite und ist deshalb besonders für die Isotopenmarker  $^{19}\text{F}$  und  $^{13}\text{C}$  geeignet. Das resultierende Spektrum erfaßt nicht nur die Signalfrequenzen, sondern auch die relaxationsabhängigen und damit bindungsmodulierten Signalintensitäten, die während der Dauer der Signalaufzeichnung entropischer  $T_2$ -Relaxation unterliegen.

Dieses Basisexperiment weist - aufgrund der minimalen Anzahl von nur einem Anregungspuls - die größte homogene Bandbreite auf und ist daher besonders geeignet, wenn Substanzmischungen mit sehr hoher spektraler Dispersion der Reportersignale vermessen werden müssen. Das Experiment weist allerdings aufgrund seiner Einfachheit auch die geringste Anzeigesicherheit auf, da die NMR-beobachtbaren bindungsinduzierten Effekte hier nicht verstärkt werden.

#### 5.4.3.4 Einsatz von Relaxationsfiltern

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Ausmaß der bindungsmodulierten Signaldämpfung aufgrund entropischer Relaxation noch durch den Einbau eines *Relaxationsfilters* verstärkt. Diese  $T_2$ - bzw.  $T_{1\rho}$ -Relaxation ist besonders geeignet, die bindungsbedingte Mobilitätsabnahme eines Liganden eindeutig anzuzeigen. Dies gilt in besonderem Maße für Isotopenmarker mit Quadrupolkern (z.B.  $^2\text{H}$ ) die besonders relaxationsempfindlich auf Änderung ihrer chemischen Umgebung reagieren. Zur Betonung des Relaxationseffektes muß lediglich die Laufzeit der NMR-Kohärenz im Experiment verlängert werden. Im Fall der  $T_2$ -Filterung geschieht dies durch Einbau eines oder mehrerer zentrischer  $180^\circ$ -Rephasierungspulse auf dem Isotopenmarker zwecks Erzielung von Spin-Echos. Im Fall der  $T_{1\rho}$ -Filterung wird die NMR-Kohärenz nicht durch Pulse periodisch rephasiert, sondern durch kontinuierliche Einstrahlung eines schwachen Radiofrequenzfeldes eingefroren (sog. *SpinLock*). Beide Verfahren sind dem Fachmann hinlänglich bekannt (Meiboom S., Gill D., *Rev. Sci. Instrum.* 1958, 29, 688; Hajduk P.J., Olejniczak E.T., Fesik S.W., *J.Am.Chem.Soc.* 1997, 119, 12257-12261: "One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules"). Die zusätzliche Betonung der bindungsinduzierten Relaxationsverluste durch den Relaxationsfilter stellt eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem in 5.4.3.3 erwähnten Basisexperiment dar. Die Wirksamkeit des Moduls nimmt stark ab mit zunehmender spektraler Dispersion der Reportersignale in Mischungen; oberhalb ca. 10 kHz spektraler Dispersion sollte diese Ausführungsform nicht mehr verwendet werden.

#### 5.4.3.5 Einsatz von Diffusionsfiltern

In einer weiteren Ausführung des beanspruchten Verfahrens wird ein Diffusionsfilter zur bindungsinduzierten Modulation der Signalintensitäten implementiert. Dies geschieht durch Einbau eines Feldgradienten-Echos (Johnson: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 1999, 34, 203-256; Wu, Chen und Johnson: *Journal of Magnetic Resonance* 1995, A115, 260). Durch den Diffusionsfilter wird die mobile freie Form stärker gedämpft als die immobile target-gebundene Form der Liganden; in derselben Richtung wirkt die (schwächere)  $T_1$ -Relaxationsdämpfung während der Diffusions-Mischzeit. Die gerade für die immobile target-gebundene Form bedeutsame entropische  $T_2$ -Relaxationsdämpfung, die unweigerlich während der Gradientenechos und der Akquisitionszeit wirkt, ist dem Effekt des Diffusionsfilters jedoch entgegengesetzt und reduziert somit unerwünscht die Amplitude der bindungsinduzierten Signalmodulation. Zur Vermeidung falsch-positiver Anzeige, bei der die diffusionsbedingte Signalverstärkung durch  $T_2$ -bedingte Signaldämpfung kompensiert wird, sollte das drug

target selbst noch NMR-beobachtbar, d.h. nicht so groß sein, daß seine rasche Relaxation zur Signalauslöschung führt.

Ansonsten besitzt das Diffusionsfilter-Modul eine höhere Bandbreite als das Relaxationsfilter-Modul und kann daher auch für Gemischspektren mit über 10 kHz gut eingesetzt werden.

#### 5.4.3.6 Einsatz und Messung des heteronuklearen $^1\text{H}$ -X-NOE als Bindungsindikator

In einer weiteren bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Reporter-Signalintensität durch den bindungsabhängigen heteronuklearen  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE moduliert. Wie dem Fachmann bekannt, wird hierzu die Protonenmagnetisierung gestört, beispielsweise durch Inversion oder bevorzugt durch kontinuierliche Einstrahlung (Sättigung). Die durch dipolare Kopplung auf den Isotopenmarker übertragene Magnetisierung wird nach einer gewissen NOE-Entwicklungszeit bzw. Sättigungsdauer (von  $10^{-1}$  bis  $10^1$  Sekunden) als Intensitätsmodulation des Reportersignales abgelesen. Sie ergibt sich durch Vergleich mit einem identischen Spektrum *ohne* Störung der Protonenmagnetisierung (hierzu wird bevorzugt im selben Experiment einfach die Protonen-Sendefrequenz um mindestens 20 kHz (bevorzugt um mindestens 50 kHz) außerhalb des Resonanzbereiches geschoben). Division beider (eindimensionalen) Spektren liefert den Wert des  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE; Division der Differenz beider Spektren durch die ungestörten Signalintensitäten liefert den Wert der  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE-Verstärkung,  $\eta$ .

Der meßbare  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE setzt sich aus mehreren Beiträgen zusammen. Der *intermolekulare*  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE zwischen Protonen des drug targets und dem Isotopenmarker des Liganden ist ein *unmittelbarer und lokaler* Bindungsindikator, zu dessen sicherer Erfäßbarkeit daher möglichst mehrere Isotopenmarker über das Ligandenmolekül verteilt vorliegen sollten. Der *intramolekulare*  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE zwischen Protonen und Isotopenmarker desselben Ligandenmoleküls zeigt als Relaxationsphänomen Bindung hingegen *indirekt und global* über eine Mobilitätsabnahme an. Mit Ausnahme des dem homonuklearen  $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ -NOE vergleichbaren heteronuklearen  $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ -NOE nehmen allgemein sowohl die Amplitude als auch die Aufbaurate des  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE mit der Mobilität ab. Für stark bindende Liganden werden zwei separate Signalsätze für freie bzw. gebundene Form beobachtet. Nur letztere kann naturgemäß die Bindung anzeigen. Für schwach bindende Liganden wird ein gemittelter Signalsatz beobachtet, in dem sich die  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE der freien und gebundenen Formen überlagern. Wiederum wird nur der Beitrag des intramolekularen  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE für den gebundenen Liganden, als *Transfer-NOE (trNOE)* bezeichnet, durch die bindungsbedingte Mobilitätsabnahme moduliert.

In einer bevorzugten Ausformung dieser Ausführung wird auf die Unterscheidung von inter- und intramolekularem  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE verzichtet, da jedwede Veränderungen der durch den  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE modulierten Reportersignal-Intensitäten nach Zugabe der Substanzmischung zum drug target offensichtlich auf Ligandenbindung zurückgeführt werden können. Dieses sehr einfache Experiment hat eine dem in 5.4.3.3 erwähnten Basisexperiment vergleichbare Bandbreite, mit den dort geschilderten Einsatzschwerpunkten. Es kann jedoch zur Kompensation intensitätsmodulierender intra- und intermolekularer NOE kommen, mit der Gefahr falsch-negativer Anzeige.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden inter- und intramolekulare  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE unterschieden, wozu eine Unterscheidung der Protonen der Substanzen und des drug targets anhand ihrer Frequenzen nötig ist. Die Zuordnung des  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE zu einem bestimmten Proton ist durch *selektive* Störung seiner Frequenzen und Beobachtung der Auswirkung auf die Reporter-Signalintensität überprüfbar. Alternativ zu diesen selektiven eindimensionalen  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE-Spektren kann ein zweidimensionales  $^1\text{H}_\text{X}$ -NOESY-Spektrum aufgenommen werden. Es enthält ausschließlich Korrelationssignale, die die Frequenzen der Isotopenmarker (in der direkten Dimension) und aller dipolar koppelnden Protonen (in der zweiten, indirekten Dimension) korrelieren.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung dieser Ausformung werden selektiv nur eindeutig dem drug target zuordenbare Protonenfrequenzen gestört (Klein, Meinecke et al.: *Journal of the American Chemical Society* 1999, 121, 5336-5337; Mayer and Meyer: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 1999, 38, 1784-1788). Je größer das drug target Molekül, umso rascher hilft das Phänomen der Spin-Diffusion bei der erwünschten Verteilung der Störung über das gesamte Molekül. Im eindimensionalen Spektrum des Isotopenmarkers offenbart sich dann ausschließlich der intermolekulare  $^1\text{H} \rightarrow \text{X}$ -NOE als Transfer von Magnetisierung bzw. Sättigung vom drug target auf den Ligand. Dieser unmittelbare und eindeutige Bindungsindikator benötigt als besonderen Vorteil *keine* Referenzmessung an der freien Substanz(mischung), mithin keinen Probenwechsel – es muß lediglich ein Vergleichsspektrum ohne Protonensättigung durchgeführt werden. In seiner Breitbandigkeit ist das Experiment dem in 5.4.3.3 erwähnten Basisexperiment vergleichbar. Es soll nur dann nicht zum Einsatz kommen, wenn sehr stark bindende Liganden (mit  $\text{KD} < 10^{-8}\text{M}$ ) gesucht werden, die mit dieser Methode nicht entdeckt werden können. Die Methode kann nur dann angewendet werden, wenn mindestens ein deutlich verschiedenes Protonen-Spektralband für das drug target bzgl. der Testsubstanzen existiert, das die erforderliche selektive Sättigung des targets erlaubt. In einer speziellen Ausführungsform wird der intermolekulare Magnetisierungs- bzw.

Sättigungstransfer invers als  $X \rightarrow {}^1\text{H}$ -NOE auf dem drug target gemessen, besonders bevorzugt im Falle  $X = {}^{19}\text{F}$ . Dies hat den Vorteil, daß aufgrund der Abwesenheit des Isotopenmarkers im drug target immer eine selektive Sättigung, in diesem Fall auf den Testsubstanzen, möglich ist und damit falsch-positive Anzeige aufgrund teilweiser intramolekularer Sättigung nicht auftreten können. Dieser Vorteil wird allerdings erkaufte mit der Notwendigkeit, das drug target NMR-spektroskopisch beobachten zu können, was dessen Größe auf maximal ca. 40-50 kDa begrenzt. Ebenso müssen die Signale aller Isotopenmarker innerhalb von Substanzmischungen innerhalb 10 kHz liegen, da sonst keine homogene Sättigung mehr möglich ist.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausgestaltung dieser Ausführungsform wird ein zweidimensionales  ${}^1\text{H}, X$ -NOESY-Spektrum aufgenommen, in dem intra- und intermolekulare  ${}^1\text{H} \rightarrow X$ -NOE über die Protonenfrequenzen unterschieden werden können. Die Beobachtung *intermolekularer* Korrelationssignale zwischen eindeutig dem drug target zuordenbaren Protonen und dem Reportersignal eines Liganden ist wiederum unmittelbarer Beweis der Bindung. Sofern die Signalpositionen der intramolekularen Protonen der einzelnen Liganden bekannt sind, kann eine Referenzmessungen entfallen. Im Falle des  ${}^1\text{H}, {}^{19}\text{F}$ -NOESY ist ausnahmsweise auch anhand der *intramolekularen* Korrelationssignale des Liganden unmittelbar eine Ligandenbindung erkennbar, da sich hier wie auch im homonuklearen  ${}^1\text{H}, {}^1\text{H}$ -NOESY eine *Vorzeichenumkehr* beim Übergang zwischen hochmobiler freier (negativ) und immobiler gebundener Form (positiv) ergibt. Im Gegensatz zum homonuklearen Fall sind – wie eingangs erwähnt – nun aber aufgrund des Isotopenmarkers sowohl schwache als auch stark bindende Liganden eindeutig erfassbar, da auch der gebundene Zustand des Liganden selektiv beobachtbar ist. Diese Experimente sind besonders dann bevorzugt, wenn mangels hinreichender spektraler Unterscheidung der Protonensignale von drug target und Testsubstanzen keine selektive Sättigung nur einer Spezies (meist das drug target) möglich ist:

Durch die selektive Erfassung des intermolekularen  ${}^1\text{H} \rightarrow X$ -NOE als unmittelbarem Bindungsindikator mittels eines dieser Experimente ergibt sich also ein modifizierter Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei dem die Aufnahme des Referenzspektrums erleichtert bzw. sogar überflüssig wird. Er umfaßt die folgenden Schritte:

- (A') Herstellung einer Mischung aus dem drug target und der Substanzmischung aus der Substanzbank gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10;
- (B') Aufnahme eines NMR-Screeningspektrums der Mischung aus Schritt (A), mit dem selektiv ein *intermolekularer* heteronuklearer Magnetisierungstransfer

zwischen Protonen des drug targets und Isotopenmarkern der Liganden erfaßt werden kann;

- (C') Aufnahme eines Referenzspektrums anhand derselben Mischung und mit demselben NMR-Experiment wie in Schritt (B), wobei nunmehr jedoch die Störung der Protonenmagnetisierung unterbleiben muß; im Falle des zweidimensionalen  $^1\text{H},\text{X}$ -NOESY-Experimentes kann die Aufnahme eines Referenzspektrums entfallen;
- (D') Identifizierung bindender Liganden anhand von Veränderungen ihrer NMR-Signale zwischen Referenz- und Screeningspektrum bzw.

Zu den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten ist weiterhin zu vermerken, daß diese, abweichend von den anderen beschriebenen Experimenten, keine stark bindenden Liganden nachzuweisen vermögen. Andererseits haben diese Experimente den Vorteil, daß sie bereits mit weitaus niedrigeren Konzentrationen des drug targets (beispielsweise im Bereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt werden können. Es empfiehlt sich deshalb bei diesen Experimenten mit einem möglichst hohen Liganden- (bzw. Substanzen-)überschuß zu arbeiten, da der Bindungsindikator durch den Anteil an dissoziierenden Liganden und nicht durch den Anteil an gebundenen Liganden geprägt ist.

#### 5.4.4 Die Identifizierung bindender Liganden (Schritt D)

Die *Identifizierung bindender Liganden* (Schritt D) erfolgt über einen Vergleich der Reportersignale der Isotopenmarker im Referenz- und im Screeningspektrum; bei Beobachtung des heteronuklearen  $^1\text{H}\rightarrow\text{X}$ -NOE als Bindungsindikator gelten die dort beschriebenen Besonderheiten. In jedem Fall werden sowohl die Signalfrequenz als auch die *relative* Signalintensität, bedarfsweise auch die Signalbreite verglichen und aus signifikanten Veränderungen auf Ligandenbindung geschlossen. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des beanspruchten Verfahrens werden zunächst die Frequenzen und *relativen* Intensitäten aller Reportersignale des Referenzspektrums für jedes Substanzgemisch erfaßt. Derartige *Referenz-Signallisten* können einfach und automatisch durch kommerzielle NMR-Software generiert werden. Anschließend wird im zugehörigen Screeningspektrum innerhalb eines gewissen Toleranzbereiches um die in der Referenz-Signalliste vorgegebenen Frequenzen nach dem (lokalen) Intensitäts-



maximum gesucht; dies erfaßt Frequenz- und Intensitätsänderungen gleichermaßen. Danach werden die Quotienten korrespondierender Signalintensitäten und ihr Mittelwert berechnet. Ein signifikant abweichender Intensitätsquotient deutet für die entsprechende Substanz auf Bindung hin. Als signifikant kann beispielsweise Divergenz um mehr als die Standardabweichung gelten. Es ist bei diesem Verfahren gleichgültig, ob bindende Liganden durch das NMR-Experiment eine Signalerhöhung (z.B. durch verlangsamte Diffusion) oder eine Signaldämpfung (z.B. durch beschleunigte Relaxation) erfahren.

## 6. Ausführungsbeispiele

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielhaft für  $^{19}\text{F}$ -detektiertes NMR-Screening eines Satzes von 12 fluorierten Verbindungen erläutert. Als target-Protein wird bovines  $\alpha\text{II}$ -Chymotrypsin eingesetzt (Sigma-Aldrich-Nr. C4129). Gemessen wurde auf einem BRUKER DMX600 (mit 600 MHz Protonenfrequenz) mit einem  $^{19}\text{F}$ ,  $^1\text{H}$  – Dualmeßkopf. Bei dieser Feldstärke liegt die  $^{19}\text{F}$ -Frequenz bei ca. 564.6 MHz.

Die fluorierten Substanzen sind samt ihrer  $^{19}\text{F}$  Signalfrequenzen in **Tabelle 1** aufgelistet. Die Meßbedingungen hierfür (0.25mM wäßrige Lösungen bei pH=7, 50mM Phosphat-Puffer, 298K) entsprechen den Probenbedingungen des target-Proteins, die für das Screening bestimmend sind. Die Substanzen wurden als 0.5M Gemisch-Stocklösung in  $\text{D}_6$ -DMSO bereitgestellt.

Für jede der Testsubstanzen wurde unter den o.a. Standardbedingungen die  $^{19}\text{F}$  chemische Verschiebung bestimmt (vgl. Tabelle 1). Um noch eine weitgehend homogene Reportersignal-Anregung gewährleisten zu können, wurden die Testsubstanzen anschließend in drei Submischungen zusammengestellt, so daß die enthaltenen  $^{19}\text{F}$ -Signale jeder Submischung eine Dispersion von maximal ca. 15 kHz aufweisen (bei 600 MHz Feldstärke). Diese drei Submischungen wurden als Gemisch-Stocklösungen bereitgestellt und auch nachfolgend vermessen. Die festen stöchiometrischen Verhältnisse der einzelnen Testsubstanzen untereinander erlauben so eine relative Referenzierung sowohl der Frequenzen als auch der Intensitäten der Reportersignale.

Abb. 1a) – c) zeigt die sehr übersichtlichen, überlagerungsfreien  $^{19}\text{F}$ -Spektren der Subgemische (unter o.a. Standardbedingungen), die pro Testsubstanz nur ein einziges Reportersignal enthalten. Im Gegensatz dazu sind die zugehörigen  $^1\text{H}$ -Spektren aufgrund der größeren Anzahl z.T. stark überlagerter Protonensignale sehr komplex, nicht mehr separierbar und werden vom nicht vollständig unterdrückbaren Wassersignal dominiert.

Die gezeigten  $^{19}\text{F}$ -Spektren wurden mit dem einfachsten und breitbandigsten Basisexperiment, bestehend aus nur einem einzigen Puls auf der  $^{19}\text{F}$ -Frequenz, aufgenommen. Der Puls hatte bei maximaler Senderleistung (ca. 50W) eine Dauer von 15  $\mu\text{s}$ , entsprechend einem Pulswinkel von ca.  $75^\circ$ . Während der Aufzeichnung des Fluorsignales wurde breitbandig von den Protonen entkoppelt (mittels WALTZ16-Sequenz (Shaka A.J., Keeler, J., Frenkiel T., Freeman R., J.Mag.Reson. 1983, 52, 335-338: "An improved sequence for broadband decoupling: WALTZ16") und einem  $90^\circ$ -

Entkoppelpuls von 74  $\mu$ s Länge). Da keine dominanten  $^{19}\text{F}$ -Hintergrundsignale existieren, konnte der Empfangsvorverstärker auf den geräteverfügbaren Maximalwert von 32K eingestellt werden. Die Spektren wurden mit 32 Scans aufgenommen und dauerten jeweils ca. 2 Minuten. Die Wartezeit zwischen einzelnen Scans betrug 3.2 s, innerhalb der die enthalpische Relaxation der  $^{19}\text{F}$ -Spins weitgehend abgeschlossen ist (verantwortlich hierfür ist primär die rasche Relaxation bei 600 MHz Feldstärke aufgrund der z.T. sehr großen chemischen Verschiebungsanisotropie des  $^{19}\text{F}$ -Kerns). Unterschiede in den Signalintensitäten sind daher primär auf leicht unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Testsubstanzen im Gemisch zurückzuführen. Dabei weist Flurbiprofen aufgrund seiner sehr geringen Löslichkeit in Wasser die deutlichste Abweichung der Signalintensität auf. Diese Intensitätsunterschiede sind jedoch unerheblich, da sie von der Gemisch-Stocklösung vorgegeben werden und damit einheitlich reproduzierbar sind im Verlauf des Screenings.

Zur Suche nach bindenden Liganden unter den Testsubstanzen wurden die Gemisch-Stocklösungen zur 1mM wäßrigen Lösung des target-Proteins  $\alpha$ II-Chymotrypsin zugegeben, bis ein vierfacher Substanzunterschluß erreicht war (d.h. 0.25mM Substanzkonzentration). Dieses inverse Konzentrationsverhältnis (bei dem das target-Protein im Überschuß vorliegt) wurde für das beschriebene Anschauungsbeispiel gewählt, da die Substanzbank mit vermuteten bzw. bekannten Ligandenmotiven angereichert war, für deren gleichzeitigen Nachweis ausreichende Proteinmengen vorhanden sein sollten. Anschließend wurde dasselbe Basisexperiment unter gleichen Proben- und Meßbedingungen wiederholt wie oben zur Aufnahme der Referenzspektren beschrieben.

Die erhaltenen  $^{19}\text{F}$ -Screening-Spektren sind in Abbildung 1 a) – c) unterlegt und zeigen deutlich und in unterschiedlicher Stärke die Bindung mehrerer Liganden, zumeist über eine Abnahme derer Reportersignal-Intensitäten, an. Referenziert wurden die Spektren, wie im Text beschrieben, auf gleiche Intensität des bzw. der jeweils intensivsten Reportersignale. Für 5-Fluoro-1-(tetrahydro-2-Furfuryl)uracil wird einzig eine Verschiebung der Frequenz des Reportersignales beobachtet, nicht aber dessen Intensitätsabnahme. Da eine Frequenzverschiebung infolge Signalmittelung (zwischen freier und gebundener Form der Substanz) jedoch auch eine Intensitätsabnahme zur Folge haben sollte, wird für diese Substanz von keiner Bindung ausgegangen. Als primärer Bindungsindikator wird also die Signalintensität, als optionaler Bindungsindikator die Signalfrequenz gewertet. Auffällig ist weiterhin, daß der bekannte schwache Ligand 3-Fluoro-dl-tyrosin nicht indiziert wird, vermutlich jedoch allein deshalb, weil er in

Gegenwart der übrigen, wahrscheinlich stärker bindenden Liganden kompetitiv verdrängt wird.

Als Blindprobe zur Verifizierung der Ergebnisse für  $\alpha$ II-Chymotrypsin wurde das Screening mit Lysozym als target-Protein wiederholt (unter identischen Proben- und Meßbedingungen). Von allen Testsubstanzen war zu erwarten, daß sie nicht an dieses Enzym binden. Die  $^{19}\text{F}$ -Spektren bestätigen dies (Fig. 1 a-c)). Etwaige minimale Veränderungen der Intensität und Frequenz der Reportersignale gegenüber dem target-freien Referenzspektrum zeigen dabei die statistische Schwankung bzw. Genauigkeit der Bindungsindikatoren an, die bei der Interpretation der Screening-Ergebnisse berücksichtigt werden muß (im beschriebenen Falle lag die statistisch irrelevante Abweichung der Signalintensität somit bei ca. 5-10%).

Nr.	Testsubstanz	$^{19}\text{F}$ chemische Verschiebung [ppm] bei 298K	Submischung
1	1-(2-Trifluoromethylphenyl)Imidazol	-59.8338	A
2	Triflurpromazin	-62.5434	A
3	2,2,2-Trifluoroethanol	-77.0377	A
4	4-Fluorobenzoessäure	-110.6738	B
5	3-Fluorophenol	-112.7807	B
6	Flurbiprofen	-119.6990	B
7	5-Fluoro-dl-Tryptophan	-125.2177	B
8	3-Fluoropyridin	-126.1083	B
9	3-Fluoro-dl-tyrosin	-136.9706	B
10	5-Fluorouridin	-165.5586	C
11	5-Fluoro-1-(tetrahydro-2-Furfuryl)uracil	-167.0751	C
12	5-Fluorouracil	-169.6517	C

**Tabelle 1** Übersicht der verwendeten fluorierten Testsubstanzen samt ihrer bei 298K bestimmten  $^{19}\text{F}$  NMR-Frequenzen (in ppm, gemessen in wäßriger Lösung mit 50mM Phosphatpuffer, pH=7.2, bei 25°C). Die angegebenen Nummern dienen der Identifizierung in den abgebildeten Spektren. Nach Analyse der  $^{19}\text{F}$  Frequenzen wurden die Substanzen in drei Submischungen dergestalt zusammengestellt, daß die Verschiebungsdispersion max. ca. 15 kHz (bei 600 MHz Feldstärke) beträgt. Die fett

gedruckten Substanzen wurden anhand einer Intensitätsabnahme ihrer Reportersignale eindeutig als bindende Liganden von  $\alpha$ II-Chymotrypsin identifiziert.

Fig.1.a zeigt das  $^{19}\text{F}$ -Spektrum der Submischung A ohne target-Protein (hellgrau, oben), mit Lysozym als Blindprobe (grau, Mitte) sowie mit  $\alpha$ II-Chymotrypsin als target-Protein (schwarz, unten). Die Reportersignale sind über die angegebenen Nummern den Testsubstanzen aus Tabelle 1 zugeordnet. Dabei ist die Signalintensität von Substanz 2 (Triflurpromazin) aufgrund ihrer sehr geringen Löslichkeit stark reduziert. Deutlich wird sie dennoch als bindender Ligand für  $\alpha$ II-Chymotrypsin, nicht jedoch für Lysozym, primär über eine Intensitätsabnahme ihres  $^{19}\text{F}$ -Reportersignales (vgl. Pfeil) angezeigt. Die leichte Intensitätsabnahme des Reportersignales von Substanz 1 (um ca. -10%) wird als statistisch irrelevant gewertet.

Fig.1.b stellt das  $^{19}\text{F}$ -Spektrum der Submischung B ohne target-Protein (hellgrau, oben), mit Lysozym als Blindprobe (grau, Mitte) sowie mit  $\alpha$ II-Chymotrypsin als target-Protein (schwarz, unten) dar. Die Reportersignale sind über die angegebenen Nummern den Testsubstanzen aus Tabelle 1 zugeordnet. Die Substanzen 4, 5, 6 und 7 werden als bindende Liganden für  $\alpha$ II-Chymotrypsin, nicht jedoch für Lysozym, primär über eine deutliche Intensitätsabnahme ihres  $^{19}\text{F}$ -Reportersignales (vgl. Pfeile) angezeigt.

Das  $^{19}\text{F}$ -Spektrum der Submischung C ohne target-Protein (hellgrau), mit Lysozym als Blindprobe (grau) sowie mit  $\alpha$ II-Chymotrypsin als target-Protein (schwarz) ist in Fig.1.c dargestellt. Die Reportersignale sind über die angegebenen Nummern den Testsubstanzen aus Tabelle 1 zugeordnet. Für Substanzen 10 und 11 wird eine leichte Verschiebung der Reportersignal-Frequenz beobachtet, jedoch nur für Substanz 10 auch eine gleichzeitige Halbierung der Signalintensität. Damit wird Substanz 10 eindeutig als Ligand für  $\alpha$ II-Chymotrypsin, nicht jedoch für Lysozym, angezeigt. Substanz 11 wird als falsch-positiv gewertet, da der primäre Bindungsindikator Signalintensität nicht anzeigt.

Somit wurde gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren geeignet ist, auch gleich mehrere z.T. stark bindende Liganden von nicht bindenden Substanzen, die in der selben Mischung vorliegen, zu unterscheiden. Daraus folgt, daß die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe der Beschleunigung des screening-Verfahrens durch die Verwendung von Mischungen auch gelöst wird ohne daß die Zuverlässigkeit der so erhaltenen Ergebnisse beeinträchtigt wird.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Zusammenstellung einer Substanzbank zum Zwecke der Wirkstoffsuche mittels heteronuklearer NMR-Spektroskopie, umfassend die folgenden Schritte:
  - (i) Auswahl einer Anzahl Substanzen, die jeweils einen oder mehrere Kerne eines Elementes bzw. Isotopes enthalten (sogenannte Isotopenmarker), welches nicht oder nur in geringer natürlicher Häufigkeit vorkommt und der Messung mittels NMR-Spektroskopie zugänglich ist;
  - (ii) Bestimmung der NMR-Resonanzfrequenzen der Isotopenmarker in den ausgewählten Substanzen;
  - (iii) Gruppierung der ausgewählten Substanzen in eine oder mehrere Teilmenge(n), so daß innerhalb jeder Teilmenge sich die Signalfrequenz eines jeden Isotopenmarkers mindestens um das Doppelte der jeweiligen Breite des Signals auf halber Höhe (sogenannte Linienbreite) von den Signalfrequenzen aller anderen Isotopenmarker innerhalb der Teilmenge unterscheidet und innerhalb jeder Teilmenge alle Signalfrequenzen der Isotopenmarker innerhalb eines spektralen Bereiches von 15 kHz fallen, mit der Maßgabe, daß die Substanzen jeder Teilmenge untereinander nicht reagieren;
  - (iv) Herstellung von einem oder mehreren Substanzgemisch(en), wobei für jedes Substanzgemisch alle Substanzen der jeweiligen Teilmenge gemäß Schritt (iii) gemischt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, worin die Substanzgemische in DMSO bei einer Konzentration von jeweils mindestens 0.05M gelöst werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin der Isotopenmarker  $^{19}\text{F}$  ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin der Isotopenmarker  $^2\text{H}$  ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, worin der Isotopenmarker  $^{13}\text{C}$  ist.
6. Substanzbank, umfassend eine Anzahl von Substanzen, wobei alle Substanzen jeweils eine oder mehrere Isotopenmarkierungen des selben Typs aufweisen

und wobei die Substanzen in einem oder mehreren Substanzgemisch(en) vorliegen, in denen innerhalb jedes Substanzgemisches sich die Signalfrequenz eines jeden Isotopenmarkers mindestens um das Doppelte der Linienbreite von den Signalfrequenzen aller anderen Isotopenmarker innerhalb des Substanzgemisches unterscheidet und innerhalb jedes Substanzgemisches alle Signalfrequenzen der Isotopenmarker innerhalb eines spektralen Bereiches von 15 kHz fallen, mit der Maßgabe, daß die Substanzen jedes Substanzgemischs untereinander nicht reagieren.

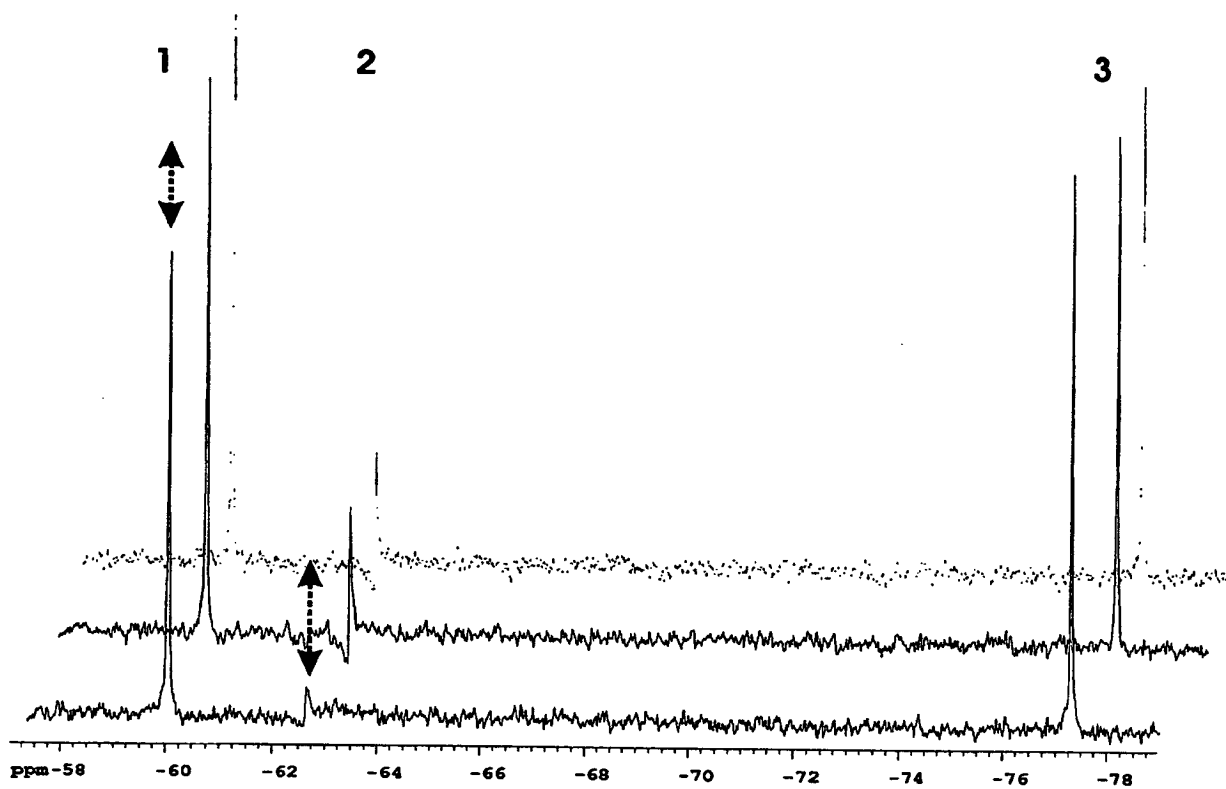
7. Substanzbank gemäß Anspruch 6, worin die Substanzgemische in DMSO bei einer Konzentration von jeweils mindestens 0.05M gelöst sind.
8. Substanzbank gemäß Anspruch 6 oder 7, worin der Isotopenmarker  $^{19}\text{F}$  ist.
9. Substanzbank gemäß Anspruch 6 oder 7, worin der Isotopenmarker  $^2\text{H}$  ist.
10. Substanzbank gemäß Anspruch 6 oder 7, worin der Isotopenmarker  $^{13}\text{C}$  ist
11. Verfahren zum Identifizieren oder screenen von Wirkstoffen, die an ein drug target binden, umfassend die folgenden Schritte:
  - (A) Aufnahme eines Referenzspektrums einer Substanzmischung aus der Substanzbank gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10, das ein nach der Isotopenmarkierung gefiltertes oder editiertes NMR-Spektrum ist, oder ein NMR Spektrum, bei dem die Signale der Isotopenmarkierung(en) direkt gemessen werden;
  - (B) Herstellung einer Mischung aus dem drug target und der Substanzmischung nach Schritt (A);
  - (C) Aufnahme eines Screeningspektrums der in Schritt (B) hergestellten Mischung unter den Meßbedingungen aus Schritt (A);
  - (D) Identifizierung bindender Liganden durch Vergleich des Screeningspektrums mit dem Referenzspektrum anhand von Veränderungen der NMR Signale oder des NMR Signals der oder des bindenden Liganden.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, worin in den Schritten (A) und (C) ein einfaches eindimensionales NMR-Spektrum des Isotopenmarkers aufgenommen wird.
13. Verfahren gemäß Anspruch 11, worin in den Schritten (A) und (C) ein eindimensionales NMR-Spektrum des Isotopenmarkers mit einem eingebauten  $T_2$ - oder  $T_{1\rho}$ -Relaxationsfilter aufgenommen wird.
14. Verfahren gemäß Anspruch 11, worin in den Schritten (A) und (C) ein eindimensionales NMR-Spektrum des Isotopenmarkers mit einem eingebauten Diffusionsfilter aufgenommen wird.
15. Verfahren gemäß Anspruch 11, worin in den Schritten (A) und (C) ein eindimensionales NMR-Spektrum des Isotopenmarkers mit einer eingebauten heteronuklearen NOE-Mischsequenz zur Übertragung von Polarisierung der Protonen auf den Isotopenmarker aufgenommen wird.
16. Verfahren nach Anspruch 11, worin in den Schritten (A) und (C) ein eindimensionales Spektrum aufgenommen wird, bei dem ein Kohärenztransfer von der Isotopenmarkierung auf skalar koppelnde Protonen erfolgt und die Detektion auf diesen Protonen erfolgt.
17. Verfahren nach Anspruch 11, worin in den Schritten (A) und (C) ein eindimensionales Spektrum aufgenommen wird, bei dem ein heteronuklearer  $X \rightarrow {}^1\text{H}$ -Magnetisierungstransfer von der Isotopenmarkierung auf benachbarte Protonen erfolgt und die Detektion auf diesen Protonen erfolgt.
18. Verfahren zum Identifizieren oder screenen von Wirkstoffen, die an ein drug target binden, umfassend die folgenden Schritte:
  - (A') Herstellung einer Mischung aus dem drug target und der Substanzmischung aus der Substanzbank gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10;
  - (B') Aufnahme eines Screeningspektrums der Mischung aus Schritt (A'), das ein NMR-Spektrum ist, bei dem ein heteronuklearer Magnetisierungstransfer von Protonen zu dem Isotopenmarker ( ${}^1\text{H}$ , X-NOE) oder von dem Isotopenmarker zu Protonen (X,  ${}^1\text{H}$ -NOE) erfolgt;

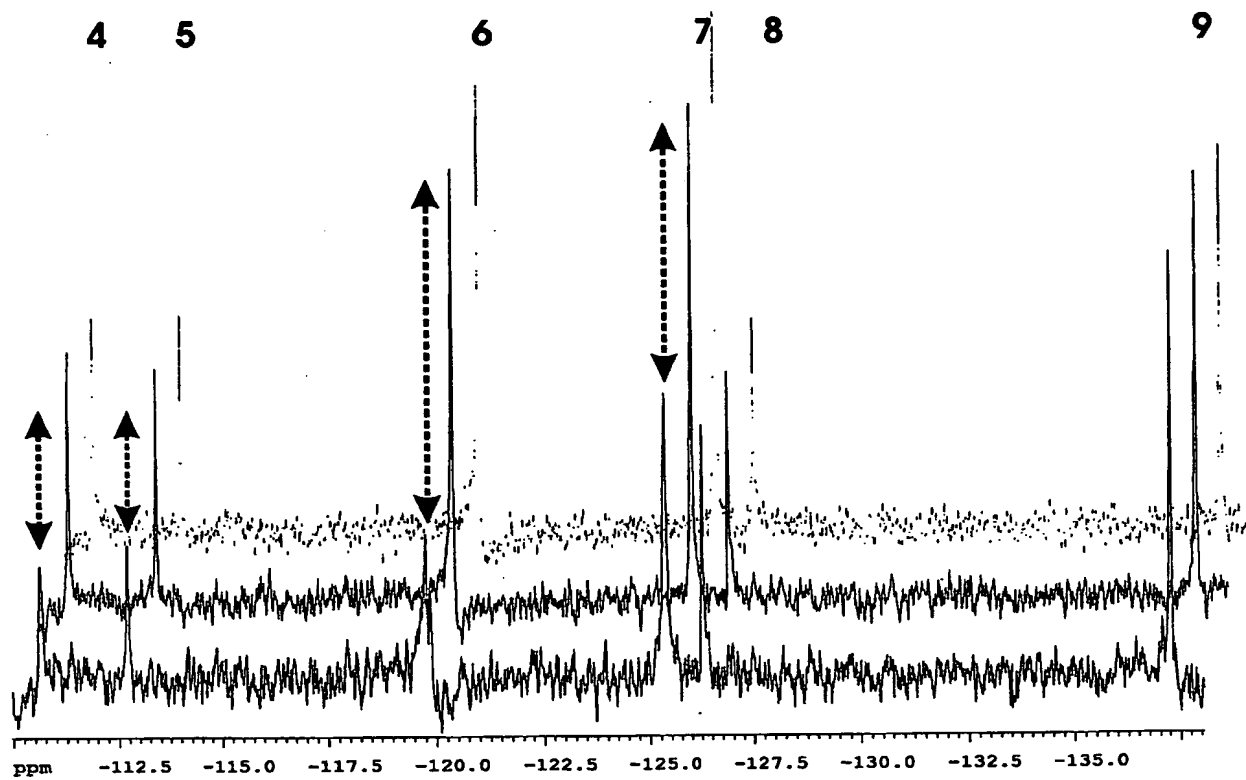


- (C') Aufnahme eines Referenzspektrums der in Schritt (A') hergestellten Mischung unter den Meßbedingungen aus Schritt (B), wobei jedoch die Sendefrequenz für Protonen um mindestens 50 kHz gegenüber der Messung aus Schritt (B') verschoben ist;
- (D') Identifizierung bindender Liganden durch Vergleich des Screeningspektrums mit dem Referenzspektrum anhand von Veränderungen der NMR Signale oder des NMR Signals der oder des bindenden Liganden.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, worin zur Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularem  $^1\text{H},\text{X}$ -NOE selektiv nur die Polarisation bzw. Sättigung von Protonen des drug targets gestört wird.
20. Verfahren gemäß Anspruch 18, worin zur Unterscheidung zwischen intra- und intermolekularem  $^1\text{H},\text{X}$ -NOE ein zweidimensionales heteronukleares  $^1\text{H},\text{X}$ -NOESY aufgenommen wird.
21. Verfahren gemäß Anspruch 18, worin ein zweidimensionales heteronukleares  $\text{X},^1\text{H}$ -NOESY aufgenommen wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 21, worin bindende Liganden anhand relativer Frequenz- und/oder Intensitätsveränderungen der Substanzgemische zwischen Referenz- und Screeningspektrum identifiziert werden.

Figur 1.a



Figur 1.b



Figur 1.c

